

Alters- und genotypbedingte Änderungen der Neuropeptidexpression im Hypothalamus von Wildtypen und Melanokortin-4 Rezeptor- defizienten Mäusen

JANINE ARENS



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung/
W. G. Kerckhoff-Institut Bad Nauheim

Betreuerin: Prof. Dr. Ingrid Schmidt

und der

Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Dr. Senckenbergische Anatomie II
Frankfurt am Main

Betreuer: Prof. Dr. Horst-Werner Korf

Eingereicht über das Institut für Veterinärphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Alters- und genotypbedingte Änderungen der Neuropeptidexpression im Hypothalamus von Wildtypen und Melanokortin-4 Rezeptor-defizienten Mäusen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
JANINE ARENS
Tierärztin aus Trier

Giessen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Dekan: Herr Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. I. Schmidt

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. R. Gerstberger

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2005

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN UND FACHAUSDRÜCKE VI

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	ADIPOSITAS	1
1.2	DAS HORMON LEPTIN UND SEINE ENTSCHEIDENDE ROLLE BEI DER REGULATION DES ENERGIEHAUSHALTES.....	3
1.2.1	Die Entdeckung von Leptin	3
1.2.2	Die Wirkung von Leptin	3
1.2.3	Regulation des Plasmaleptinspiegels	4
1.2.3.1	<i>Einfluss des Körperfettgehaltes auf den Plasmaleptinspiegel</i>	4
1.2.3.2	<i>Einfluss anderer Faktoren auf den Plasmaleptinspiegel</i>	4
1.2.4	Rezeptoren und Wirkungsorte von Leptin.....	6
1.2.4.1	<i>Die verschiedenen Rezeptortypen.....</i>	6
1.2.4.2	<i>Der Hypothalamus als Hauptwirkungsort für Leptin</i>	7
1.3	SIGNALTRANSDUKTION DER LEPTINWIRKUNG.....	8
1.3.1	NPY und seine orexigene Rolle bei der Transduktion des Leptinsignals.....	9
1.3.1.1	<i>NPY Quellen:.....</i>	9
1.3.1.2	<i>Zielgebiete der NPY vermittelten Hungerstimulation</i>	10
1.3.1.3	<i>Kontrolle der NPY Expression.....</i>	10
1.3.2	α -MSH und seine anorexigene Rolle in der Transduktion des Leptinsignals	11
1.3.2.1	<i>α-MSH Quelle: POMC.....</i>	12
1.3.2.2	<i>Zielgebiete der α-MSH vermittelten Hungerreduktion.....</i>	12
1.3.2.3	<i>Kontrolle der POMC Expression im Hypothalamus</i>	13
1.3.3	AGRP und seine orexigene Rolle in der Transduktion des Leptinsignals.....	14
1.3.3.1	<i>AGRP Quellen.....</i>	14
1.3.3.2	<i>Zielgebiete der AGRP vermittelten Hungerstimulation</i>	14
1.3.3.3	<i>Kontrolle der AGRP Expression im Hypothalamus</i>	14
1.3.4	CART und seine anorexigene Rolle in der Transduktion des Leptinsignals.....	15
1.3.4.1	<i>CART Quellen</i>	15
1.3.4.2	<i>Zielgebiete der CART vermittelten Hungerreduktion</i>	16
1.3.4.3	<i>Kontrolle der CART Expression im Hypothalamus</i>	16
1.3.5	Zusammenfassung der Leptinwirkung	16

1.4	BEDEUTUNG VON STÖRUNGEN IN DER ZENTRALEN VERARBEITUNG VON	
	MELANOKORTINSIGNALEN.....	17
1.4.1	Störungen der Funktion des Melanokortin-4 Rezeptors (MC4R)	17
1.4.2	Die Melanokortin-4 Rezeptor „Knockout“ Maus.....	18
1.4.2.1	Phänotypische Merkmale der MC4R-defizienten Maus	18
1.4.2.2	Veränderungen der physiologischen Parameter bei MC4R-defizienten Mäusen....	19
1.4.3	Haploinsuffizienz des MC4r beim Menschen	20
1.5	ZIELE DER ARBEIT	21
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	VERSUCHSTIERE	23
2.2	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	23
2.2.1	Bestimmung der Neuropeptidexpression im Nukleus arcuatus	23
2.2.2	Physiologische Auswertung	25
2.3	PRÄPARATIONSMETHODEN	26
2.3.1	Tötung der Versuchstiere und Plasmagewinnung	26
2.3.2	Präparation der Gehirne.....	26
2.3.3	Eviszeration zur Bestimmung der Körperzusammensetzung	26
2.3.4	Bestimmung der Körperzusammensetzung.....	27
2.3.5	Anfertigen der Gehirnschnitte	27
2.4	ANALYSEVERFAHREN	28
2.4.1	Molekularbiologische Genotypbestimmung	28
2.4.1.1	Isolierung und Aufbereitung der DNA aus Gewebeproben.....	28
2.4.1.2	Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	28
2.4.1.3	Elektrophorese.....	29
2.4.2	Radioimmunoassay zur Bestimmung der Hormonkonzentration im Blutplasma.....	30
2.4.2.1	Allgemeines zur Durchführung eines Radioimmunoassays.....	30
2.4.2.2	Bestimmung der Leptinkonzentration im Blutplasma	30
2.4.2.3	Bestimmung der Insulinkonzentration im Blutplasma	32

2.4.3	<i>In situ</i> Hybridisierung	33
2.4.3.1	<i>Sonden</i>	33
2.4.3.1.1	Transformation der Plasmide.....	34
2.4.3.1.2	Plasmidisolierung.....	34
2.4.3.1.3	Linearisierung der Plasmide.....	35
2.4.3.1.4	Elektrophorese	36
2.4.3.2	Markierung der Nukleinsäure.....	37
2.4.3.3	Nachweis der Hybridisierungsstellen.....	37
2.4.4	Radioaktive <i>in situ</i> Hybridisierung	38
2.4.4.1	Herstellung der Sonde (<i>in vitro</i> Transkription).....	38
2.4.4.2	Herstellung des Hybridisierungspuffers.....	39
2.4.4.3	Herstellung der Hybridisierungslösung	39
2.4.4.4	Fixierung und Hybridisierung der Gehirnschnitte	39
2.4.4.5	Posthybridisierung	39
2.4.4.6	Filmautoradiographie.....	40
2.4.4.7	Auswertung der Röntgenfilme.....	40
2.4.5	Nicht-radioaktive <i>in situ</i> Hybridisierung	41
2.4.5.1	RNA-Markierung.....	41
2.4.5.2	Kontrolle der Sonde	41
2.4.5.3	Herstellung der Hybridisierungslösung	42
2.4.5.4	Fixierung und Hybridisierung der Gehirnschnitte	42
2.4.5.5	Posthybridisierung	43
2.4.5.6	Auswertung der Schnitte	43
2.4.6	Histologische Färbemethoden.....	43
2.4.6.1	Nisslfärbung mit Kresylviolett	43
2.4.6.2	Kernechtrotfärbung.....	44
2.5	STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG	44
2.5.1	Allgemeine Angaben.....	44
2.5.2	Regressionsanalysen.....	45
2.5.2.1	Lineare Korrelationen.....	45
2.5.2.2	Nicht-lineare Korrelationen.....	45
2.5.3	z-Transformation	46
2.5.4	Varianzanalysen.....	47

3	ERGEBNISSE.....	49
3.1	UNTERSUCHUNG DER NEUROPEPTIDEXPRESSION IM NUKLEUS ARCUATUS BEI 35 UND 56 TAGE ALTEN TIEREN	49
3.1.1	Einfluss systemischer Parameter auf die Neuropeptidexpression - Vergleich der parallelen und "gepoolten" Darstellungen	49
3.1.2	Einfluss des Genotyps auf die Neuropeptidexpression	54
3.2	UNTERSUCHUNG PHYSIOLOGISCHER PARAMETER BEI 9 MONATE ALTEN TIEREN.....	56
3.2.1	Körperfettgehalt und Wassergehalt.....	56
3.2.2	Feuchtmasse und Fettfreie Trockenmasse (FFDM).....	57
3.2.3	Feuchtmasse und Körperfett	58
3.2.4	Auswirkungen des Genotyps und des Geschlechts auf die Körperzusammensetzung.....	59
3.2.5	Körperfett und Plasmaleptingehalt.....	61
3.2.6	Körperfett und Plasmainsulingehalt.....	63
3.2.7	Auswirkungen des Genotyps und des Geschlechts auf die Plasmakonzentration von Leptin und Insulin.....	64
3.2.8	Beziehung zwischen der Leptin- und Insulinkonzentration im Plasma.....	67
3.3	UNTERSUCHUNG DER NEUROPEPTIDEXPRESSION IM ARC BEI 9 MONATE ALTEN TIEREN IM VERHÄLTNIS ZU DEN JÜNGEREN TIEREN.....	69
3.3.1	Einfluss systemischer Parameter auf die Neuropeptidexpression.....	69
3.3.2	Einfluss des Genotyps auf die Neuropeptidexpression	71
3.3.3	Untersuchung zur Koexpression der Neuropeptide.....	74
3.4	UNTERSUCHUNG DER NEUROPEPTIDEXPRESSION IM VENTROMEDIALEN (VMN) UND DORSOMEDIALEN NUKLEUS (DMN) VON TIEREN BEIDER ALTERSGRUPPEN.....	75
4	DISKUSSION.....	81
4.1	UNTERSUCHUNG DER NEUROPEPTIDEXPRESSION IM ARC	81
4.1.1	Einfluss von Körperfettgehalt, Plasmaleptinspiegel und Genotyp auf die Neuropeptidexpression von 35 und 56 Tage alten Tieren.....	81
4.1.1.1	Einfluss auf die NPY Expression	82
4.1.1.2	Einfluss auf die POMC Expression	84
4.1.1.3	Einfluss auf die AGRP Expression	86
4.1.1.4	Einfluss auf die CART Expression.....	87

4.1.2	Wie interagieren die untersuchten systemischen Parameter, das Alter und eine MC4R Defizienz hinsichtlich der Neuropeptidexpression im ARC?.....	88
4.1.3	Gibt es einen Einfluss des Insulinspiegels auf die Neuropeptidexpression im ARC? .	91
4.1.4	Interaktion der untersuchten Neuropeptide.....	92
4.1.5	Veränderungen in der Beziehung zwischen koexprimierten Neuropeptiden kommen auch in anderen Tiermodellen vor.....	97
4.2	ANALYSE SYSTEMISCHER PARAMETER BEI WILDTYPEN UND MC4R-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	99
4.2.1	Einfluss des Genotyps auf die Körperzusammensetzung	99
4.2.2	Einfluss des Geschlechts auf die Körperzusammensetzung	103
4.2.3	Einfluss von Genotyp und Geschlecht auf die untersuchte Hormonkonzentration ...	104
4.3	UNTERSUCHUNG DER NEUROPEPTIDEXPRESSION IM VMN UND DMN.....	107
4.3.1	Die induzierte NPY Expression im VMN und DMN hängt von Alter, Körperfettgehalt und Genotyp ab.....	107
4.3.2	Wodurch könnte die NPY Expression im VMN und DMN in den 9 Monate alten MC4R-defizienten Mäusen verursacht werden?	109
4.4	FAZIT UND AUSBLICK.....	114
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	116
6	SUMMARY	119
7	ANHANG – VERWENDETE CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN.....	121
8	LITERATURVERZEICHNIS	127
9	DANKSAGUNG	151

Abkürzungen und Fachausdrücke

+/+	homozygoter Träger des Wildtyp-Allels des Melanokortin-4 Rezeptor Gens
+/-	heterozygoter Träger des defekten Allels des Melanokortin-4 Rezeptor Gens
-/-	homozygoter Träger des defekten Allels des Melanokortin-4 Rezeptor Gens
¹⁴ C	radioaktives Kohlenstoff-Isotop
¹²⁵ I	radioaktives Iod-Isotop
³⁵ S	radioaktives Schwefel-Isotop
<i>ad libitum</i>	zu freier Verfügung
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
pro-ACTH	Vorstufe des adrenocorticotropen Hormons
AGRP	„Agouti-related protein“
α-MSH	„alpha-melanocyte-stimulating hormone“; α-Melanozyten-stimulierendes Hormon, Melanokortinfamilie
anorexigen	appetithemmend
<i>antisense</i> -RNA	RNA mit komplementärer Basensequenz zu der im Gewebe nachzuweisenden RNA
AP	Area postrema
<i>Aqua dest.</i>	„aqua destillata“, destilliertes Wasser
ARC	Nukleus arcuatus des Hypothalamus
ATP	Adenosintriphosphat
β-LPH	β-Lipotrophin
β-MSH	β-Melanozyten-stimulierendes Hormon
b	Proportionalitätskonstante der unabhängigen Variablen im Exponenten von <i>e</i>
b[0]	mathematische Variable, beschreibt den y-Achsenabschnitt in der linearen Gleichung $y = mx + b[0]$
B ₀	Leerprobe im Radioimmunoassay
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BMI	„body mass index“ (Quotient aus Körpergewicht [kg] und dem Quadrat der Körpergröße [m ²])

bp	Basenpaare
Bregma	Schnittpunkt der coronalen und sagittalen Suturen auf dem Schädeldach
C57Bl/6J	Bezeichnung eines Inzucht-Mäusestamms
CART	„cocaine-and-amphetamine-regulated transcript“
cDNA	geklonte stabile mRNA-Kopie
c-fos	Gen des Transkriptionsfaktors Fos
c-Fos	Transkriptionsfaktor (Peptid) Fos
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	"counts per million", Maßeinheit für radioaktiven Zerfall
CrK(SO ₄) ₂ *12H ₂ O	Chromkaliumsulfat-12-Hydrat
CTP	Cytosintriphosphat
d21, d35, d56	„day 21, 35, 56“, Alter der Versuchstiere zum Tötungszeitpunkt
<i>db/db</i> -Maus	homozygoter Träger einer Mutation, die zum Ausfall des Leptinrezeptors führt
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMN	Nukleus dorsomedialis des Hypothalamus
DNA/DNS	„deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA-spaltendes Enzym
dNTP	Desoxyribonukleosid Triphosphat
„down-regulation“	Herunterregulation der Expression z.B. eines Neuropeptids oder eines Rezeptors
DPX	p-Xylen-bis (N-pyridin-bromid)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	„ethylenediaminetetraacetic acid“, Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
E _{max}	Maximale Energie
<i>et al.</i>	" <i>et alii</i> ", lat.: und andere
EtOH	Äthanol
<i>fa/fa</i> -Ratte	homozygoter Träger eines genetischen Defektes, der zum Ausfall des Leptinrezeptors führt

FFDM	„fat-free dry-mass“, fettfreie Trockenmasse
γ -MSH	γ -Melanozyten-stimulierendes Hormon
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
Hybridisierung	Verbindung zweier komplementärer Nukleinsäure-Einzelstränge zu einem Doppelstrang
I1-I4	erste bis vierte <i>in situ</i> Hybridisierung
<i>icv</i>	"intracerebroventrikulär" = innerhalb des Gehirnvatrikels
IgG	γ -Immunglobuline
<i>in situ</i>	„am natürlichen Ort“, hier: an anatomisch und morphologisch unversehrten Gehirnschnitten von Mäusen
Inter-Assay Variabilität	Variabilität zwischen verschiedenen Radioimmunoassays
Intra-Assay Variabilität	Variabilität innerhalb eines Radioimmunoassays
<i>in vitro</i>	„im (Reagenz-) Glas“, d.h. außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
IOD	integrierte optische Dichte
<i>ip</i>	intraperitoneal
I.U.	„international unit“, internationale Einheit
JAK	„janus-kinase“, Thyrosinkinase der Janus-Familie
kDa	Kilo-Dalton, atomare Maßeinheit
LB-Medium	„Luria-Bertani“-Standardnährmedium für E. Coli
<i>LepR</i>	Leptinrezeptor-Gen
LepR	Leptinrezeptor (wird in der neueren Literatur und in der vorliegenden Arbeit statt Ob-R verwendet), verschiedene Subtypen (LepR-Ra, LepR-Rb, Lep-Re)
LH	„lateral hypothalamic area“, lateraler Hypothalamus
LiCl	Lithiumchlorid
M	Einheit des Molekulargewichtes 1 Mol
9 Mo	„9 Monate“, Alter der Versuchstiere zum Tötungszeitpunkt
MC3R	Melanokortin-3 Rezeptor
MC4R	Melanokortin-4 Rezeptor

<i>MC4r</i>	Gen, das den MC4R codiert
<i>MC4r</i> -KO Maus	Melanokortin-4 Rezeptor-Knockout Maus
MC4R-defiziente Maus	hetero- und homozygoter Träger des defekten <i>MC4r</i>
MCH	"melanocortin concentrating hormone"
MeV	Mega Elektronenvolt, physikalische Einheit für Energie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgCl ₂ *6H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
MR	metabolische Rate
mRNA	„messenger ribonucleic acid“, Boten-Ribonukleinsäure
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon (mehrere Typen: α; β; γ)
MTII	synthetischer α-MSH Agonist
N	Anzahl der untersuchten Tiere
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	Natrium-di-Hydrogenphosphat-Dihydrat
Na ₂ HPO ₄	di-Natrium-Hydrogenphosphat-Anhydrat
NBT	Nitroblautetrazolium
NPY	Neuropeptid Y
<i>Npy</i>	NPY codierendes Gen
<i>Npy</i> -KO Maus	Neuropeptid Y-Knockout Maus, bei der das NPY-exprimierende Gen ausgeschaltet wurde, so dass das Tier kein funktionelles NPY synthetisieren kann
NSB	„non specific binding“, unspezifische Bindung des „Tracers“ im Radioimmunoassay
NTS	Nukleus tractus solitarius
<i>ob</i>	steht für eine Mutation des Leptin-codierenden Gens ("obesity")
<i>ob/ob</i> -Maus	homozygoter Träger für den Defekt im <i>ob</i> -Gen, der kein funktionelles Leptin synthetisieren kann
<i>ob</i> -R	veraltete Bezeichnung für den Leptinrezeptor, heute LepR
orexigen	appetitsteigernd
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PA	"prä-optical area" prä-optische Region

PBS	„phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PC1,2	Pro-Hormon Convertasen
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFH	perifornikale Region des Hypothalamus
pGK	Phosphoglycerinkinase
POMC	„pro-opiomelanocortin“, Pro-Opiomelanokortin, Ausgangspeptid für mehrere Hormone (ACTH; MSH)
„ <i>Poolen</i> “ von Daten	Bearbeitung verschiedener Datensätze, so dass aus den einzelnen Datensätzen ein gemeinsamer Datensatz entsteht
PVN	Nukleus paraventricularis des Hypothalamus
RIA	Radioimmunoassay
Ribosonden	einzelsträngige Ribonukleinsäure-Sonden
rNTP	Ribonukleosid Triphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinsäure-spaltendes Enzym
RNA-Sonde	einzelsträngige markierte Basensequenz, die dem spezifischen Nachweis von komplementärer RNA im Gewebe dient
SCN	Nukleus suprachiasmaticus des Hypothalamus
SE	“standard-error“, Standardfehler des Mittelwertes
<i>sense</i> -RNA	RNA mit identischer Basensequenz wie die im Gewebe nachzuweisende RNA
SHBG	“sex hormone binding globulin“
SHU9119	synthetischer MC4R Antagonist
SSC	Natriumchlorid / Natriumcitrat-Puffer
STAT3	„signal transducers and activators of transcription 3“
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
<i>template</i>	linearisiertes cDNA-Fragment, das als Transkriptionsvorlage der RNA-Sonde im Rahmen einer <i>in situ</i> Hybridisierung dient
t_m	Schmelztemperatur, bestimmt die Stabilität eines DNA/RNA-Doppelstranges

T ₀	Totalaktivität im Radioimmunoassay
Tracer	radioaktiv markiertes Antigen bekannter Konzentration im Radioimmunoassay
tRNA	„transfer ribonucleic acid“, Transfer-Ribonukleinsäure
U	„Unit“, Einheit für die Aktivität eines Enzyms, 1 Unit ist definiert als die Menge eines Enzyms, die pro min 1 µmol eines Substrates in einer chemischen Reaktion umwandelt
U/min	Umdrehungen pro Minute
"up-regulation"	Hochregulation der Expression z.B. eines Neuropeptids oder eines Rezeptors
UTP	Uridintriphosphat
Vektor	„Träger“, Transportsystem (z.B. Plasmid)
VMN	Nukleus ventromedialis des Hypothalamus
Y ₁₋₅	NPY-Rezeptor Subtypen

1 Einleitung

1.1 Adipositas

Bei der Adipositas handelt es sich um eine komplexe Störung, die als eine über das Normalmaß hinausgehende Erhöhung des Körperfettgewebes und damit einhergehende Zunahme des Körpergewichtes definiert wird. Energetisch ist sie das Resultat einer über einen längeren Zeitraum bestehenden positiven Energiebilanz; die mit der Nahrung zugeführte Energie überwiegt also gegenüber dem Energieverbrauch des Organismus. Grundsätzlich sicherte die Fähigkeit von Mensch und Tier, zum einen überschüssige Energie in Fettgewebe zu speichern und zum anderen den Energieumsatz in Zeiten von Nahrungsknappeit zu senken, im Laufe der Evolution das Überleben und war ein entscheidender Selektionsvorteil. In den heutigen Industrienationen mit ihrem fast unlimitierten Nahrungsangebot entwickelt sich diese Eigenschaft jedoch zu einem wachsenden medizinischen Problem. Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie arterielle Hypertonie (Assmann & Schulte, 1992; Ferrannini, 1995), koronare Herzerkrankungen (Willett *et al.*, 1995) und Herzinsuffizienz (Hubert *et al.*, 1983; Alpert & Hashimi, 1993) haben eine hohe Prävalenz. Diabetes mellitus Typ II (Colditz *et al.*, 1990, 1995; Chan *et al.*, 1994) und Hyper- oder Dyslipidämie (Després, 1991; Wechsler *et al.*, 1981) treten regelmäßig im Zusammenhang mit Adipositas auf. Die Risiken für einen Schlaganfall steigen mit zunehmendem Body Mass Index¹ (BMI) (Rexrode *et al.*, 1997; Abbott *et al.*, 1994), einige Tumorerkrankungen wie Kolon-, Gallenwegs-, Endometrium- oder Mammakarzinom sind positiv mit erhöhtem Körpergewicht korreliert (Everett *et al.*, 2003; Stephenson *et al.*, 2003; World Health Organization, 2003; Mao *et al.*, 2003). Das hohe Körpergewicht belastet zusätzlich Muskeln, Knochen, Gelenke und den Respirationsapparat (World Health Organization, 1997b; Kopelman, 2000; Felson, 1992).

In den letzten Jahrzehnten entwickelte sich die Adipositas zu einer der bedeutendsten Krankheitsursachen in den westlichen Nationen und sie spielt in heutiger Zeit als Krankheitsauslöser bereits eine größere Rolle als Unterernährung und Infektionskrankheiten. Die Adipositas breitet sich endemisch bei Menschen und kleineren Haustieren aus. Neben Erwachsenen sind auch in zunehmendem Maße Kinder und Jugendliche betroffen. Vor allem in

¹ Die Klassifizierung der Adipositas beim Menschen erfolgt mit Hilfe des Body Mass Index (BMI), dem Quotienten aus Körpermasse [kg] und dem Quadrat der Körpergröße [m²] (World Health Organization, 1997a).

den letzten Jahren wurde daher die Notwendigkeit erkannt, präventiv gegen Übergewicht und Stoffwechselstörungen vorzugehen. Die Aufklärung der Genese der Adipositas und die Entwicklung therapeutischer Maßnahmen ist somit von großem wissenschaftlichen und industriellen Interesse.

Die Ursachen der Adipositas sind multifaktoriell. Bedeutsam ist vor allem eine Wechselwirkung polygener Konstellationen, als Voraussetzung für Störungen der Körpergewichts- und Körperfettregulation, mit verschiedenen Umwelteinflüssen, insbesondere Ernährungsfehlern und Bewegungsmangel (Kopelman, 2000). Diese daraus entstehenden komplexen Störungen in peripheren und zentralen Mechanismen der Körpergewichts- bzw. Körperfettregulation und die daraus resultierende Zunahme der Fettdepots ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Einen ersten Einblick in mögliche Ursachen der Adipositas ergab die Erforschung verschiedener Tiermodelle, in denen definierte Komponenten in der Regulation des Körpergewichts und des Körperfettgehaltes durch genetische Manipulation defekt sind. Es sind einige Zuchtstämme von Nagern bekannt, bei denen Adipositas als eine erbliche Störung auftritt. Dies gilt für die *ob/ob*-Mäuse - diese Tiere können kein funktionelles Leptin synthetisieren (Zhang *et al.*, 1994) - und ebenso für die *db/db*-Mäuse oder die *fa/fa*-Ratte, denen der Leptinrezeptor fehlt (Chua *et al.*, 1996). Die Entdeckung des Hormons Leptin und seiner Rezeptoren als wesentliche Glieder im zentralen Regulationsmechanismus war ein entscheidender Schritt in der Erforschung der Körpergewichts- und Körperfettregulation (Zhang *et al.*, 1994; Tartaglia *et al.*, 1995).

Eine weitere Möglichkeit, unter definierten Bedingungen in den Regelkreis der Körperfettregulation einzugreifen, ist die gezielte Ausschaltung von Kerngebieten im Gehirn. Auf diesem Wege konnten die wichtigsten zentralen Kerngebiete, ihre Aufgaben und ihre Verknüpfungen untereinander identifiziert werden. In neuerer Zeit gelangen an Nagern gezielte genetische Eingriffe in Systeme, bei denen eine Beteiligung an der Regulation des Energiehaushaltes vermutet wird. Auf diese Weise wurde ein Mäusestamm degeneriert, in dem ein Defekt des Melanokortin-4 Rezeptor-Gens (*MC4r*) vererbt wird (*MC4r*-, „Knockout“-Mäuse (*MC4r*-KO Mäuse)).

1.2 Das Hormon Leptin und seine entscheidende Rolle bei der Regulation des Energiehaushaltes

1.2.1 Die Entdeckung von Leptin

Kennedy vermutete bereits 1953 in seiner lipostatischen Theorie einen im Blut zirkulierenden Faktor, der Informationen über die Größe der Fettspeicher weiterleitet und über eine Rückkopplung zum Gehirn die Nahrungsaufnahme kontrolliert (Kennedy, 1953). Coleman führte 20 Jahre später Parabioseversuche mit genetisch adipösen und normalgewichtigen Mäusen durch und bestätigte die Existenz eines humoralen Signalstoffes, der der Regulierung der Futteraufnahme dient (Coleman, 1973). 1994 gelang die Klonierung des *ob*-Gens und die damit verbundene Entdeckung des vom Fettgewebe synthetisierten Botenstoffes Leptin (gr. *leptos* = dünn) (Zhang *et al.*, 1994). Im darauf folgenden Jahr konnte das Gen (*LepR*) für den zugehörigen Leptinrezeptor (LepR oder auch *ob*-R) identifiziert werden.

1.2.2 Die Wirkung von Leptin

In den nachfolgenden Jahren wurde intensiv nach den Wirkungsmechanismen von Leptin geforscht. Es wurde deutlich, dass die Funktion dieses Hormons weit über einen reinen Sättigungsfaktor hinausgeht. Leptin scheint über einen Rückkopplungsmechanismus Informationen über die Größe der Fettspeicher an das Gehirn zu vermitteln und kann als afferentes „Adipositas-Signal“ bezeichnet werden (Woods & Seeley, 2000). Leptin spielt eine zentrale Rolle im Energiehaushalt, es reguliert den Körperfettgehalt nicht nur, indem es die Nahrungsaufnahme hemmt, sondern es kann auch den Energieverbrauch beeinflussen. Leptin übt jedoch noch viele andere Funktionen im Organismus aus (Ahima & Flier, 2000; Harris, 2000; Trayhurn *et al.*, 1999). Es besteht eine Interaktion mit wichtigen hormonellen Organsystemen, wie den Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-, -Gonaden-, -Schilddrüsen- und -Wachstums-Achsen. Zudem ist Leptin für die Adaptation des Organismus an Hungerperioden (Flier, 1998; Ahima & Flier, 2000) zuständig. Eine besondere Bedeutung kommt der Wechselwirkung mit dem Hormon Insulin zu (Wauters *et al.*, 2000). Leptin spielt eine Rolle im Rahmen der Angiogenese (Sierra-Honigmann *et al.*, 1998), der Immunabwehr (Lord *et al.*, 1998), der Hämatopoese und Osteogenese (Pighetti *et al.*, 1999), in der Gehirnentwicklung (Steppan & Swick, 1999; Ahima *et al.*, 1999), bei sexueller Reifung und Reproduktionsfunktionen (Zamorano *et al.*, 1997; Bi *et al.*, 1999; Harris, 2000; Ahima & Flier, 2000).

1.2.3 Regulation des Plasmaleptinspiegels

Die Produktion des Hormons findet hauptsächlich in den Adipozyten des weißen Fettgewebes statt (Zhang *et al.*, 1994). Neben dem weißen Fettgewebe wurde eine Leptinproduktion auch in braunem Fettgewebe, Skelettmuskulatur, Epithelien des Magenfundus, Milchdrüsenepithel und in der Plazenta nachgewiesen (Oliver *et al.*, 2001; Dessolin *et al.*, 1997; Masuzaki *et al.*, 1997; Bado *et al.*, 1998; Morton *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Einige Studien lassen zudem eine Leptinproduktion im Gehirn vermuten (Morash *et al.*, 1999; Wiesner *et al.*, 1999).

Leptin wird über das Blut in verschiedenen Geweben wie Gehirn, Jejunum, Leber, Magen und Lunge (Hill *et al.*, 1998) verteilt. Die Ausscheidung des Hormons erfolgt zum großen Teil über die glomeruläre Filtration in den Nieren (Cumin *et al.*, 1996; 1997). Ein Abbau von Leptin im Körper wurde bis jetzt nicht nachgewiesen.

1.2.3.1 Einfluss des Körperfettgehaltes auf den Plasmaleptinspiegel

Der Plasmaleptinspiegel, der mit radioimmunologischen Methoden bestimmt werden kann, gibt die Gesamtkonzentration von freiem und an Transportproteine gebundenem Leptin im Blut an (Sinha *et al.*, 1996a; Pelleymounter, 1997; Landt, 2000; Ahima & Flier, 2000). In mehreren Studien konnte die enge Korrelation der Plasmaleptinkonzentration mit der Körperfettmasse bei Menschen und Nagern belegt werden (Maffei *et al.*, 1995; Considine & Caro, 1997; Rosenbaum *et al.*, 1996). Beeinflussende Faktoren der Leptinexpression und -sekretion wie z.B. Triglyceridkonzentration, andere Metaboliten des Lipidstoffwechsels oder der Füllungszustand der Adipozyten konnten jedoch bis jetzt noch nicht eindeutig bestimmt werden (Ahima & Flier, 2000; Mason *et al.*, 1998; Hamilton *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001).

1.2.3.2 Einfluss anderer Faktoren auf den Plasmaleptinspiegel

Unabhängig von der Größe der Fettspeicher steigt die Plasmaleptinkonzentration bei Nagern wenige Stunden nach der Nahrungsaufnahme an (Saladin *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1996). Während des Fastens hingegen sinkt der Plasmaleptinspiegel bei Nagern und auch beim Menschen bereits innerhalb kurzer Zeit ab (Wagner *et al.*, 2000; Boden *et al.*, 1997; Kolaczynski *et al.*, 1996; Trayhurn *et al.*, 1995), wobei die Größe dieser Veränderung in keinem Bezug zu der Änderung der Fettmasse in diesem Zeitraum steht. Möglicherweise bestimmt in diesem

Zusammenhang die Stoffwechselaktivität der Adipozyten die Leptinsekretion (Coleman & Herrmann, 1999; Havel *et al.*, 1996; Hufnagel, 2001).

Die Expression von Leptin wird des Weiteren direkt vom sympathischen Nervensystem kontrolliert (Zhang *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 1999), sympathisch freigesetzte Katecholamine hemmen die Leptinexpression über β_3 -Rezeptoren (Trayhurn *et al.*, 1998; Gettys *et al.*, 1996). Glukokortikoide wirken generell stimulierend auf die Leptinsynthese (Considine *et al.*, 1997; Zakrzewska *et al.*, 1999, Murakami *et al.*, 1995).

Ebenfalls unabhängig vom Körperfettgehalt besteht eine enge Korrelation zwischen dem Leptin- und dem Insulinsystem (Boden *et al.*, 1997; Kamoda *et al.*, 1998). Insulin stimuliert die Leptinexpression und -sekretion (Barr *et al.*, 1997; Wabitsch *et al.*, 1996; Hardie *et al.*, 1996). Leptin hingegen hemmt die Insulinsekretion (Emilsson *et al.*, 1997; Kulkarni *et al.*, 1997; Kieffer *et al.*, 1997).

Auch Sexualhormone beeinflussen das Leptinsystem. *In vitro* Versuche zeigen, dass Adipozyten weiblicher Tiere eine höhere Leptinproduktion aufweisen als Fettzellen männlicher Tiere (Casabiell *et al.*, 1998). Östrogen stimuliert die Leptinsekretion aus Fettzellen weiblicher Tiere (Kristensen *et al.*, 1999; Sivan *et al.*, 1998) und ovariohysterektomierte Tiere weisen niedrige Plasmaleptinspiegel auf, die jedoch durch Östradiolgabe normalisiert werden können (Kristensen *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1997). Leptinmangel bewirkt eine Suppression der weiblichen Sexualhormone, so dass die Ovulation bei andauernden Hungerzuständen unterdrückt wird (Ahima *et al.*, 1996). Androgene wirken inhibitorisch auf die Leptinproduktion menschlicher Adipozyten (Wabitsch *et al.*, 1997). Bei männlichen Ratten wurde durch Testosteron zwar eine Verminderung der Leptinexpression erreicht, der Plasmaleptinspiegel blieb jedoch unverändert (Wu-Peng *et al.*, 1999) Bei männlichen Tieren besteht vermutlich eine inverse Korrelation zwischen Leptin und Testosteron (Garcia-Mayor *et al.*, 1997; Wabitsch *et al.*, 1997; Behre *et al.*, 1997, Janssen *et al.*, 1998; Haffner *et al.*, 1997).

Letztendlich besteht eine negative Rückkopplung von Leptin auf seine eigene Produktion (Wang *et al.*, 1999). Es wird sowohl ein peripherer autokriner Rückkopplungsmechanismus (Wang *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997) als auch ein zentraler, sympathisch vermittelter Mechanismus vermutet (Zhang *et al.*, 2001; Sliker *et al.*, 1996).

1.2.4 Rezeptoren und Wirkungsorte von Leptin

1.2.4.1 *Die verschiedenen Rezeptortypen*

Die Wirkung von Leptin wird über eine Bindung an Leptinrezeptoren (LepR) vermittelt, die sowohl in peripheren als auch in zentralen Geweben zu finden sind. Zurzeit sind sechs Isoformen dieser zur Cytokin I-Rezeptorfamilie gehörenden Rezeptoren bekannt, die unterschiedliche Funktionen ausüben (Chen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996). Neben fünf kurzen Rezeptoren ist eine lange Isoform (LepR-Rb) bekannt, die als einzige der verschiedenen Leptinrezeptortypen die JAK/STAT (janus kinase/signal transducers and activators of transcription) Signalkaskade aktiviert (Vaisse *et al.*, 1996). Der LepR-Rb gilt als hauptsächlicher Vermittler der Leptinwirkung im Gehirn (Trayhurn *et al.*, 1999). Die kurze LepR-Re Isoform stellt ein Transportprotein für Leptin im Blutplasma dar (Lee *et al.*, 1996; Ahima & Flier, 2000). Die LepR-Ra Isoform kommt in peripheren Geweben wie z.B. der Niere vor und wird dort mit dem Abbau von Leptin in Zusammenhang gebracht (Ahima & Flier, 2000). Da der LepR-Ra ebenfalls in großer Menge im Plexus choroideus des Gehirns exprimiert wird, wird eine Rolle beim Transport von Leptin in und aus der Cerebrospinalflüssigkeit angenommen (Ahima & Flier, 2000; Bjorbaek *et al.*, 1998).

Der LepR-Rb wird hauptsächlich in ventrobasalen und ventromedialen Bereichen des Hypothalamus exprimiert, die im Zusammenhang mit der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushalts stehen (Ahima & Flier, 2000; Elmquist *et al.*, 1998; Mercer *et al.*, 1996a). Die höchste Dichte an Leptinrezeptoren findet sich im Nukleus arcuatus (ARC) des Hypothalamus (Mercer *et al.*, 1996a,b; Guan *et al.*, 1997; Elmquist *et al.*, 1998). Des Weiteren sind die Kerne des dorso- und ventromedialen Hypothalamus (DMN und VMN) reich an LepR-Rb-Expression. Außerhalb des Hypothalamus finden sich Leptinrezeptoren im Thalamus und Cerebellum (Elmquist *et al.*, 1998; Hakansson *et al.*, 1998; Mercer *et al.*, 1996a), ihre Rolle ist noch nicht geklärt (Ahima *et al.*, 2000).

Die Signal-transduzierende Form LepR-Rb befindet sich auch in zahlreichen peripheren Geweben, allerdings in wesentlich geringerer Dichte. *In vitro* Experimente zeigen eine direkte Wirkung von Leptin in Bauchspeicheldrüse, Niere, Nebenniere, Leber, Skelettmuskulatur, Fettzellen und Ovarien (Greisen *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1996; Berti *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1997; Poitout *et al.*, 1998).

1.2.4.2 Der Hypothalamus als Hauptwirkungsort für Leptin

Der Hypothalamus ist ein phylogenetisch sehr altes Gebiet des Gehirns. Er wird rostral von der prä-optischen Region (PA, abgeleitet von der englischen Nomenklatur: *prä-optical area*), dorsal von Thalamus und Mittelhirn und caudal von der Pons begrenzt. In zahlreichen Versuchen, in denen gezielte Läsionen in verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus gesetzt wurden, wurde seine Rolle in der Regulation von Nahrungsaufnahme und Energiehaushalt aufgedeckt. Folgende bilateral symmetrisch angelegte Kerngebiete sind an diesem komplexen Regelkreislauf beteiligt: Der ARC liegt am ventralen Rand des Hypothalamus, er grenzt an den dritten Ventrikel und caudal an die Mammillarkörper. Im ARC und im lateralen Hypothalamus (LH) findet die Synthese orexigener und anorexigener Neuropeptide statt. Der LH ist ein Kerngebiet im caudo-dorsalen Bereich des Hypothalamus. Die Synthese der Neuropeptide wird in den Kerngebieten VMN und DMN reguliert. Der VMN liegt rostro-dorsal des ARC; der DMN liegt dorsal des ARC und VMN und grenzt an die caudalen Anteile des dritten Ventrikels. Der rostro-ventral liegende Nukleus suprachiasmaticus (SCN) ist für die Regulation der Nahrungsaufnahme im Zusammenhang mit Hell-Dunkel-Zyklus und täglicher Rhythmik zuständig. Hauptsächlicher Zielort der orexigenen und anorexigenen Neuropeptide ist der paraventriculäre Nukleus (PVN). Er liegt als ein sehr großes paramedianes Kerngebiet im rostro-dorsalen Viertel des Hypothalamus (Kalra *et al.*, 1999).

Aufgrund zahlreicher Studien, in denen Mikroläsionen in den verschiedenen Kerngebieten gesetzt wurden, konnten Funktionsweisen und Verknüpfungen dieser Kerngebiete erforscht werden. Läsionen im VMN führen zu rapider Hyperphagie und Gewichtszunahme über einen lang andauernden Zeitraum (Brobeck, 1946; Anand & Brobeck, 1951; Powley *et al.*, 1980). Läsionen im VMN sind mit verschiedenen neuroendokrinen Störungen verbunden, die Hyperphagie und Adipositas begünstigen (Kalra *et al.*, 1996a; 1998a,b). Vagale Hyperaktivität und die daraus resultierende Hyperinsulinämie scheinen die primären Auslöser in der Änderung der Futteraufnahme und in der Körpergewichtsregulation zu sein, obwohl wahrscheinlich viele andere Faktoren ebenfalls eine Rolle spielen (Levin, 1986). Über Jahre wurde der VMN als „satiety center“ bezeichnet (Morley, 1987; Scalfani, 1971; Scalfani & Kirchgessner, 1986). Läsionen im LH hingegen führen zu temporärer Aphagie und Gewichtsreduktion. Dies führte zu der Bezeichnung des „feeding center“ (Brobeck, 1946; Anand & Brobeck, 1951). Tägliche elektrische Stimulation der Neurone im LH führt zu verstärkter Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme. Läsionen im DMN unterbrechen die Nahrungsaufnahme, jedoch ist der Effekt wesentlich geringer als bei Läsionen im VMN (Bernadis & Bellinger, 1987). Ein Defekt

des PVN als Kreuzungspunkt für orexigene Signale verursacht ebenfalls Hyperphagie und Gewichtszunahme (Aravich *et al.*, 1983; Weingarten *et al.*, 1985). Läsionen im SCN führen zu einem Verlust der tagesrhythmisch regulierten Nahrungsaufnahme. Alle diese Kerngebiete des Hypothalamus bilden ein „appetit-regulierendes Netzwerk“ (Kalra *et al.*, 1999).

1.3 Signaltransduktion der Leptinwirkung

Leptin wird an Plasmaproteine oder an LepR-Re gebunden zu seinem Hauptwirkungsgebiet, dem Gehirn, transportiert. Im Bereich der den ARC umgebenden Eminentia mediana ist die Blut-Hirn Schranke aufgehoben, so dass Leptin hier in den Hypothalamus gelangen kann (Schwartz *et al.*, 1996b; Gross, 1992). Ein sättigbarer Transportmechanismus von Leptin durch die Blut-Hirn Schranke wird von einigen Autoren diskutiert, konnte aber bisher nicht bestätigt werden (Bjorbaek *et al.*, 1998; Banks *et al.*, 1996; Pardridge, 1986). LepR-Rb wird in Neuronen des ARC, VMN und DMN exprimiert, die Neuropeptide synthetisieren und freisetzen, die die Wirkung des Adipositas-Signals weiter vermitteln (Ahima & Flier, 2000). Im medialen Bereich des ARC exprimieren Neurone die orexigenen Peptide Neuropeptid Y (NPY) und *Agouti*-related protein (AGRP). Im lateralen Gebiet des ARC sind die anorexigenen Pro-Opiomelanokortin (POMC) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART) Neurone lokalisiert (Mercer *et al.*, 1996b; Baskin *et al.*, 1999a; Cheung *et al.*, 1997; Elmquist *et al.*, 1999; Ahima *et al.*, 2000). Durch Bindung von Leptin an LepR-Rb wird die JAK/STAT3-Signalkaskade aktiviert und dadurch die Expression der verschiedenen Neuropeptide beeinflusst. Leptin bedingt einen Expressionsanstieg des POMC, aus dem α -Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH) gebildet wird, welches anorexigen wirkt. CART wird mit POMC koexprimiert und ebenfalls durch Leptin stimuliert. Im Gegensatz dazu wird die Expression der orexigenen Peptide wie NPY oder AGRP durch eine Aktivierung des Leptinrezeptors gehemmt, die Nahrungsaufnahme wird somit reduziert. NPY und α -MSH werden entscheidende, durch Leptin vermittelte Rollen in der Regulation von Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch zugeschrieben (Friedman, 1997). Leptin beeinflusst auch die Expression anderer Neurotransmitter wie Orexin oder Melanin-concentrating-Hormone (MCH) (Elmquist *et al.*, 1999).

1.3.1 NPY und seine orexigene Rolle bei der Transduktion des Leptinsignals

NPY ist ein Peptid der Pankreas-Polypeptid-Familie und gilt zurzeit als der stärkste Hungerstimulator (Clark *et al.*, 1984, 1987). Das Neuropeptid ist ein natürlich vorkommender Appetit-vermittelnder Transmitter, der unter physiologischen Bedingungen ein essentieller Bestandteil des appetit-regulierenden Netzwerks im Hypothalamus ist (Kalra, 1997; Kalra *et al.*, 1996b, 1999). Neben seiner orexigenen Wirkung senkt NPY zusätzlich den Energieverbrauch, indem es die sympathisch aktivierte thermoregulatorische Thermogenese hemmt (Billington *et al.*, 1994; Egawa *et al.*, 1991).

1.3.1.1 NPY Quellen:

NPY-exprimierende Neurone kommen in zahlreichen Gehirnregionen vor (Kalra *et al.*, 1996b; Chronwall, 1988; Everitt *et al.*, 1989). Man kann zwei große Subpopulationen unterscheiden:

1) NPY-exprimierende Neurone im Hirnstamm. NPY wird hier mit anderen, ebenfalls orexigen wirkenden Transmittern (AGRP, Noradrenalin, Adrenalin, Orexin) co-produziert (Everitt *et al.*, 1989; Holets *et al.*, 1988). Diese Neurone innervieren eine Vielzahl hypothalamischer Gebiete wie ARC, VMN, DMN, aber hauptsächlich den PVN (Everitt *et al.*, 1989; Chronwall *et al.*, 1988; Sahu *et al.*, 1988a) und interagieren mit diesen Kerngebieten.

2) NPY-exprimierende Neurone in hypothalamischen Kerngebieten (Kalra, 1997; Kalra *et al.*, 1996b). Im ARC des Hypothalamus findet man die höchste Konzentration an NPY-exprimierenden Neuronen, die große Mengen des Neuropeptids synthetisieren und hauptsächlich zum PVN, aber in geringerer Dichte auch zum DMN projizieren (Bai *et al.*, 1985; Baker *et al.*, 1995). Aus den Projektionen zum DMN werden unter physiologischen Bedingungen nur geringe NPY Mengen im PVN freigesetzt (Bai *et al.*, 1985; Sahu *et al.*, 1988b), aber aufgrund von Entgleisungen, die mit Hyperphagie einher gehen können, kann der DMN selbst große Mengen an NPY synthetisieren und über Projektionen zum PVN senden (Pu *et al.*, 1998; Kesterson *et al.*, 1997). Auch der VMN sollte als NPY Quelle für den PVN in Betracht gezogen werden, da Läsionen dieses Kerngebiets zu einer verminderten NPY Konzentration im PVN führen (Dube *et al.*, 1992, 1999). Der PVN kann also als wesentliches Zielgebiet für NPY-haltige Projektionen aus anderen Kerngebieten angesehen werden, eine gesteigerte Synthese von NPY-mRNA findet innerhalb des PVN aber nur bei einer Unterbrechung der VMN Achse statt (Pu *et al.*, 1998).

1.3.1.2 Zielgebiete der NPY vermittelten Hungerstimulation

Die Zielgebiete, in denen NPY in die Nahrungsaufnahme eingreift, liegen im paraventriculären Gebiet des Hypothalamus (Clark *et al.*, 1984, 1987). Injektionen von NPY in den dritten Ventrikel führten bei gesättigten Ratten zu einer erneuten Nahrungsaufnahme. Auch Injektionen in hypothalamische Gebiete wirkten hungerstimulierend (Morley, 1987; Stanley *et al.*, 1985). Neben dem PVN war dabei die caudal gelegene perifornicale Region des Hypothalamus (PFH) das Gebiet mit der höchsten Antwort auf die Injektionen (Stanley *et al.*, 1985, 1993). Allerdings sind weitere Zielgebiete für NPY im extra-hypothalamischen Bereich, v.a. im Hirnstamm nicht auszuschließen, da Injektionen von NPY in den vierten Ventrikel ebenfalls zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme führten (Xu *et al.*, 1995). Die NPY Rezeptorsubtypen Y_1 (Kalra *et al.*, 1996a, 1998a; Dumont *et al.*, 1997; Matthews *et al.*, 1997; Daniels *et al.*, 1995) und Y_5 (Gerald *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1996; Schaffhauser *et al.*, 1997; Criscione *et al.*, 1997), die die NPY bedingte Beeinflussung der Nahrungsaufnahme vermitteln, finden sich in den Gehirnarealen, in denen Mikroinjektionen von NPY die Nahrungsaufnahme steigern (Stanley *et al.*, 1985).

Ein weiteres Zielgebiet für NPY ist der ARC selber, da dort neben den zahlreichen NPY-produzierenden Neuronen auch NPY-haltige Projektionen aus dem Hirnstamm vorkommen (Everitt *et al.*, 1989) und Kollaterale zahlreich sind (Meister *et al.*, 1989). Injektionen in den dritten und vierten Ventrikel stimulieren im ARC die Expression des Transkriptionsfaktors c-fos (Li *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1995) über Aktivierung von Y_1 - und Y_5 -Rezeptoren (Mikkelsen & Larsen, 1992; Larsen *et al.*, 1993; Gerald *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1996; Broberger *et al.*, 1997; Fuxe *et al.*, 1997). Die NPY-synthetisierenden Neurone des ARC weisen darüber hinaus eine synaptische Verknüpfung mit den Neuronen, die anorexigene Signale synthetisieren, auf (Horvath *et al.*, 1992, 1996). Der Y_1 Rezeptor kommt in NPY- und POMC-produzierenden Neuronen vor (Broberger *et al.*, 1997). NPY scheint also nicht nur seine eigene Synthese zu beeinflussen, sondern auch die Produktion anderer Signale im ARC.

1.3.1.3 Kontrolle der NPY Expression

Die Regulation der NPY Expression im Hypothalamus während der täglichen Nahrungsaufnahme ist sehr komplex und multifaktoriell. Bei Nagern, die nur während der Dunkelphase Nahrung aufnehmen, zeigt sich eine circadiane Veränderung der hypothalamischen NPY Synthese, -Freisetzung und -Konzentration. Eine Komponente, die von der circadianen Uhr

gesteuert wird, scheint den täglichen Rhythmus der Genexpression zu steuern (Xu *et al.*, 1996, 1998; Steiner *et al.*, 1994).

Aufgrund seiner anatomischen Lage steht das NPY System im Hypothalamus in enger Verbindung mit zirkulierenden Signalen. Steroide aus den Gonaden und der Nebennierenrinde (Sar *et al.*, 1990; Sahu *et al.*, 1992, 1994; Hisano *et al.*, 1988; Harfstrand *et al.*, 1989; Larsen *et al.*, 1994) beeinflussen dieses System ebenso wie Insulin, Leptin oder Zytokine (Kalra *et al.*, 1999; Nicolaidis, 1978; Schwartz *et al.*, 1992).

Leptin spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der NPY Expression. NPY-synthetisierende Neurone des ARC gelten als ein Hauptziel für Leptin. Prinzipiell ist eine verstärkte NPY Expression als die biologische Antwort auf einen niedrigen Plasmaleptinspiegel im Hungerzustand anzusehen (Friedman, 1997; Williams *et al.*, 2001). Ein hoher Leptinspiegel im Blut bewirkt hingegen eine Hemmung der NPY-Synthese und -Ausschüttung (Elmqvist *et al.*, 1999). Mäuse, die aufgrund von Nahrungsentzug einen niedrigen Plasmaleptinspiegel haben, weisen demzufolge eine erhöhte NPY-Expression im ARC auf. *ob/ob*-Mäuse zeigen ebenfalls eine Überexpression von NPY. Behandelt man diese Tiere jedoch mit Leptin, wird die verstärkte Synthese des orexigenen Neuropeptids verhindert (Stephens *et al.*, 1995; Ahima *et al.*, 1996, 2000; Schwartz *et al.*, 1996a; Mercer *et al.*, 1997). Neben der nachgewiesenen zentralen Rolle des NPY in der Vermittlung der Leptinwirkung scheint das NPY System jedoch nicht der alleinige Mediator der Leptinwirkung zu sein: Interessanterweise weisen genetisch NPY-defiziente (*Npy*-KO) Mäuse ein normales Körpergewicht auf und reagieren physiologisch auf exogene Leptin Zufuhr. Eine Ausschaltung des *Npy*-Gens geht also nicht prinzipiell mit verminderter Nahrungsaufnahme und reduziertem Körpergewicht einher (Erickson *et al.*, 1996a; Ahima *et al.*, 2000). Kreuzungen von *Npy*-KO Mäusen mit *ob/ob*-Mäusen sind zwar weniger adipös als *ob/ob*-Mäuse, haben aber dennoch ein höheres Körpergewicht als Wildtyp-Mäuse (Erickson *et al.*, 1996b).

1.3.2 α -MSH und seine anorexigene Rolle in der Transduktion des Leptinsignals

Das bioaktive Peptid α -MSH, das aus dem Pro-Hormon POMC entsteht, wird in Neuronen des Hypothalamus gebildet und wirkt als endogener Ligand des Melanokortin-4 Rezeptor (MC4R), α -MSH zählt zu den Schlüsselmolekülen der Appetitkontrolle und Energiehomeostase.

1.3.2.1 α -MSH Quelle: POMC

POMC wird in Hypophyse, Haut, Immunsystem und Gehirn exprimiert (Yeo *et al.*, 2000). Innerhalb des Gehirns beschränkt sich die POMC Expression auf den ARC des Hypothalamus und auf den Nukleus tractus solitarius (NTS) der caudalen Medulla oblongata (Young *et al.*, 1998), auf den in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen wird.

Im Hypothalamus wird POMC post-translational modifiziert. Das 32 kDa pro-Peptid wird über den Golgiapparat in sekretorische Granula eingebaut (Cool *et al.*, 1997) und dort durch Enzyme (z.B. pro-Hormon Convertasen, u.a. PC1, PC2) in pro-ACTH (pro-adrenocortico- tropisches Hormon) und β -Lipotrophin (β -LPH) gespalten. Aus pro-ACTH entsteht einerseits ACTH und andererseits über Zwischenstufen γ -MSH. ACTH kann weitergehend modifiziert werden, über Zwischenmoleküle entsteht dabei funktionsfähiges α -MSH. β -LPH wird zu β -MSH und β -Endorphin umgewandelt (Pritchard *et al.*, 2002).

1.3.2.2 Zielgebiete der α -MSH vermittelten Hungerreduktion

Das zur Melanokortinfamilie gehörende α -MSH ist der natürliche Ligand der im Zentralnervensystem vorherrschenden Melanokortinrezeptoren 3 und 4 (MC3R; MC4R) (Fan *et al.*, 1997; Schiöth *et al.*, 1997). Der MC3R wird im Hypothalamus, dem limbischen System, aber auch in peripheren Geweben wie dem Magen-Darm-Trakt und der Plazenta exprimiert (Gantz *et al.*, 1993a; Roselli-Rehfuss *et al.*, 1993). MC4R kommen hingegen ausschließlich im Gehirn vor. Dieser Rezeptorsubtyp wurde in Neuronen des DMN, LH und PVN, aber auch in extrahypothalamischen Gehirngebieten wie Thalamus, Cortex und Stammhirn nachgewiesen (Gantz *et al.*, 1993b; Mountjoy *et al.*, 1994). Die Beteiligung des Melanokortinsystems an der Regulation des Körpergewichts konnte in pharmakologischen Studien gezeigt werden: Eine chronische *intracerebroventrikuläre* (icv) Gabe von α -MSH über 6 Tage bei Ratten sowie eine einmalige *icv*-Gabe des synthetischen α -MSH Agonisten MTII bei Mäusen bewirkte eine Reduktion der Futteraufnahme und des Körpergewichts von normalgewichtigen und adipösen Tieren (Fan *et al.*, 1997; Thiele *et al.*, 1998; McMinn *et al.*, 2000). Die Verabreichung des synthetischen MC4R Antagonisten SHU9119 steigerte die Futteraufnahme (Fan *et al.*, 1997; Seeley *et al.*, 1997; Kask *et al.*, 1998). Eine Beteiligung des MC3R an der Regulation des Energiehaushaltes kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden (Cummings & Schwartz, 2000).

1.3.2.3 Kontrolle der POMC Expression im Hypothalamus

Die POMC Expression im Hypothalamus wird abhängig von dem energetischen Zustand im Körper gesteuert. Ein akuter Futterentzug führt bei Nagern zu einer „down-regulation“ von POMC (Brady *et al.*, 1990; Bergendahl *et al.*, 1992; Mizuno *et al.*, 1998). Eine „up-regulation“ von POMC findet man dagegen in überfütterten Ratten (Hagan *et al.*, 1999). Die Kontrolle der Transkription von POMC wird durch Leptin vermittelt. Die POMC-mRNA Spiegel von Leptin- und Leptinrezeptor-defizienten Nagern (*ob/ob*-Mäuse, *db/db*-Mäuse, *fa/fa*-Ratten) sind signifikant niedriger als die der Kontrollgruppen. Eine Leptinbehandlung führt zu einem Anstieg der POMC-mRNA im Hypothalamus (Schwartz *et al.*, 1997; Mizuno *et al.*, 1998; Thornton *et al.*, 1997). Der Aktivierungsmechanismus der POMC Expression durch Leptin ist noch nicht vollständig aufgeklärt, eine direkte Modulation durch STAT Proteine, die bei Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs durch den LepR-Rb entstehen, wird angenommen. Ein Hinweis darauf ist, dass STAT3 in POMC Neuronen exprimiert wird (Hakansson & Meister, 1998) und *in vitro* zu einer direkten Regulation der POMC Expression führt (Bousquet *et al.*, 2000). Ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung zwischen Leptin und dem melanokortinergen System ist die Koexpression von LepR-Rb und POMC-mRNA im ARC (Cheung *et al.*, 1997).

Neben Leptin wird auch ein stimulierender Einfluss von Plasmainsulin und Blutglukose auf die POMC Expression im Hypothalamus diskutiert (Kim *et al.*, 1999; Mizuno *et al.*, 1999). Ebenso führen Glukokortikoide zu einer „up-regulation“ der Expression im Hypothalamus, obwohl es in der Hypophyse zu einer inhibitorischen Wirkung auf POMC-haltige Zellen kommt (Wardlaw *et al.*, 1998). Die Mehrzahl der hypothalamischen POMC Neurone koexprimieren Glukokortikoidrezeptoren. Andere einflussnehmende Faktoren auf das POMC System sind Corticotropin Releasing Faktor (CRF), Leukämie inhibitorischer Faktor (LIF) und Interleukin-6-Cytokine.

Die Regulation der post-translationalen Modifikation von POMC im Hypothalamus wird über die Menge der Enzyme kontrolliert, die in den POMC Neuronen als Antwort auf Schwankungen im Energiehaushalt aktiviert werden (Pritchard *et al.*, 2002). Ein direkter Einfluss metabolischer Stoffe (z.B. Glukokortikoide) auf die Enzyme wird ebenfalls diskutiert (Dong *et al.*, 1997).

1.3.3 AGRP und seine orexigene Rolle in der Transduktion des Leptinsignals

AGRP ist ein orexigenes Neuropeptid, das in genetischer Struktur und Größe nahezu identisch ist mit dem *Agouti* Protein, das über einen parakrinen Mechanismus die Hautpigmentation beeinflusst (Ollmann *et al.*, 1997). AGRP ist der natürliche Antagonist des α -MSH und dient somit der Feinabstimmung des α -MSH Systems.

1.3.3.1 *AGRP Quellen*

AGRP-mRNA findet sich hauptsächlich in Hypothalamus und Nebenniere, daneben aber auch in geringer Menge in Niere, Lunge, Ovar und Muskel (Ollmann *et al.*, 1997). Im Gehirn lässt sich AGRP-mRNA nur im ARC nachweisen (Ollmann *et al.*, 1997; Broberger *et al.*, 1998). AGRP wird im ARC zu über 98% in NPY-exprimierenden Zellen synthetisiert (Broberger *et al.*, 1998; Shutter *et al.*, 1997).

1.3.3.2 *Zielgebiete der AGRP vermittelten Hungerstimulation*

Dichte AGRP-haltige Projektionen aus dem ARC wurden im Hypothalamus und in der Region des Septums nachgewiesen (Haskell-Luevano *et al.*, 1999). Im Hypothalamus ziehen diese Faserbündel vom ARC entlang des dritten Ventrikels, in Teile der PA, in den PVN, den DMN und den Nukleus posterior (PH) (Haskell-Luevano *et al.*, 1999). Im VMN finden sich keine AGRP-haltige Fasern. In sämtlichen Projektionen, die AGRP enthalten, ist stets auch NPY nachweisbar (Broberger *et al.*, 1998; Kalra *et al.*, 1999). Die Zielgebiete von AGRP weisen ebenfalls eine dichte POMC Innervation auf (Jacobowitz *et al.*, 1978; Watson *et al.*, 1977; Haskell-Luevano *et al.*, 1999; Bagnol *et al.*, 1999). AGRP kann dort als ein potenter Antagonist des α -MSH wirken und seinen Gegenspieler kompetitiv vom MC4R verdrängen (Ollmann *et al.*, 1997; Haskell-Luevano & Monck, 2001). Dieser kompetitive Antagonismus wurde auch an einem konstitutiven MC4R *in vitro* (Haskell-Luevano & Monck, 2001) nachgewiesen.

1.3.3.3 *Kontrolle der AGRP Expression im Hypothalamus*

Die AGRP Expression im Hypothalamus wird durch Leptin beeinflusst. Da die AGRP Spiegel in *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen bis zu 10-fach erhöht sind (Ollmann *et al.*, 1997; Shutter *et al.*, 1997), scheint Leptin einen negativen Einfluss auf die Neuropeptidexpression auszuüben. Lässt man Wildtyp-Mäuse fasten, steigt die AGRP-mRNA bis 48 h nach Futter-

entzug deutlich an. Führt man denselben Versuch an *ob/ob*-Mäusen durch, kann man weder nach 48 h noch nach 72 h einen Anstieg der Expression von AGRP nachweisen (Wilson *et al.*, 1999). Die *intraperitoneale* (*ip*) Gabe von Leptin, die sowohl bei Wildtypen als auch bei *ob/ob*-Mäusen mit reduzierter Futteraufnahme einhergeht, führt bei den Leptin-defizienten Tieren zu einem deutlichen Absinken der AGRP-mRNA, während es bei den Wildtypen nur zu einer geringen, aber dennoch signifikanten Reduktion der AGRP Expression kommt (Wilson *et al.*, 1999). *Yellow-Agouti* (*A^y*)-Mäuse zeigen nach *ip*-Gabe von Leptin, die in der Kontrollgruppe mit Futterreduktion und einer 12%igen Gewichtsreduktion einhergeht, keine Veränderung in Nahrungsaufnahme oder Gewicht (Halaas *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1999). Bis zu 25% der AGRP Neurone im ARC exprimieren LepR-Rb (Wilson *et al.*, 1999; Fei *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 2000).

Des Weiteren wird AGRP durch Glukokortikoide beeinflusst. Ein Kortikosteronimplantat, das für 48 h implantiert wird, führt zu einem Anstieg an AGRP-mRNA. Ein erhöhter Glukokortikoidspiegel beeinflusst die „up-regulation“ der AGRP Expression nach Fasten, wohingegen man bei adrenaletomierten Tieren derselben Versuchsreihe keinen Anstieg nachweisen kann (Makimura *et al.*, 2003).

1.3.4 CART und seine anorexigene Rolle in der Transduktion des Leptinsignals

CART ist ein hypothalamisches Neuropeptid mit stark anorexigener Wirkung, das sogar eine Hungerstimulation durch NPY außer Kraft setzen kann (Thim *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 1998). Das Peptid wird in verschiedenen Längen synthetisiert, wobei CART 55-102 das potenteste zu sein scheint (Kuhar *et al.*, 2002). Interessanterweise führte die Verabreichung von CART 55-102 in bestimmte Regionen des Hypothalamus (z.B. in den ARC oder VMN) zu einer gesteigerten Futteraufnahme (Abbott *et al.*, 2001), dementsprechend kann CART auch orexigen wirken.

1.3.4.1 *CART Quellen*

CART wird ausschließlich im Gehirn und in endokrinen Geweben exprimiert (Douglass *et al.*, 1995; Douglass & Daoud, 1996). Im Gehirn wird die größte Menge an CART-mRNA im Hypothalamus, hier besonders in ARC, DMN, VMN, LH und PVN, nachgewiesen, gefolgt von Mittelhirn und Thalamus. Geringere Mengen werden im Rhombencephalon, Hippocampus,

Striatum und Cortex gebildet (Douglass *et al.*, 1995; Broberger 1999). Im ARC wird CART mit POMC (Vrang *et al.*, 1999; Elias *et al.*, 1998), im LH mit dem orexigenen MCH koexprimiert. Auf eine neuroanatomische Verknüpfung mit NPY im PVN weisen Lambert *et al.* (1998) und Kalra *et al.* (1999) hin. Die Präsenz von CART Peptiden in PVN, ARC und DMN führt zu der Annahme, dass CART ein „downstream“ Ziel von NPY sein könnte (Broberger, 1999).

1.3.4.2 Zielgebiete der CART vermittelten Hungerreduktion

Projektionen aus CART-synthetisierenden Neuronen ziehen in zahlreiche Kerngebiete des Hypothalamus (Kalra *et al.*, 1999). Daneben sind terminale Endigungen von CART Neuronen in hoher Konzentration in der ventralen Area tegmentalis (VTA) zu finden (Koylu *et al.*, 1998; Kuhar *et al.*, 2002). Die meisten dieser Projektionen entspringen im Hypothalamus, unter anderen im LH und in der PFH (Kuhar *et al.*, 2002; Saper *et al.*, 1979).

1.3.4.3 Kontrolle der CART Expression im Hypothalamus

Leptin scheint, wie auch auf die anderen Neuropeptide des Hypothalamus, eine Wirkung auf die CART Expression zu haben. Während des Hungerzustandes, also eines Zustands, in dem der Plasmaleptinspiegel sinkt, steigen die CART-mRNA Spiegel in ARC und DMN an (Kalra *et al.*, 1999). *Ob/ob*-Mäuse sowie *fa/fa*-Ratten haben niedrigere CART-mRNA Spiegel in ARC und DMN als Wildtypen. Eine Leptinapplikation, die mit einer reduzierten Futteraufnahme einhergeht, führt in *ob/ob*-Mäusen zu einem deutlichen Anstieg der CART Expression (Kalra *et al.*, 1999).

1.3.5 Zusammenfassung der Leptinwirkung

Leptin wird von den Adipozyten synthetisiert und entfaltet seine Hauptwirkung auf den Energiehaushalt im Hypothalamus. Das Hormon bindet dort an seinen Rezeptor LepR-Rb und beeinflusst darüber die Expression von Neuropeptiden im ARC. Leptin hemmt die Expression der orexigenen Peptide NPY und AGRP und steigert die mRNA Synthese der Pro-Peptide POMC und CART, deren Spaltprodukte α -MSH und CART 55-102 die anorexigene Wirkung von Leptin weitervermitteln. Die nachgeschalteten Kerngebiete VMN und DMN leiten die Signale an den PVN weiter, in dem die eingehenden Signale so verschaltet werden, dass es unter der Leptinwirkung zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme kommt.

1.4 Bedeutung von Störungen in der zentralen Verarbeitung von Melanokortinsignalen

Da MC4R-exprimierende Neurone vermutlich synaptisch mit POMC Neuronen im ARC verbunden sind, kann man davon ausgehen, dass Leptin- und Melanokortinsignale zentral synergistisch agieren. Leptin beeinflusst über die gesteigerte Expression von POMC im ARC die Bildung und Freisetzung von α MSH und auf diesem Weg die Nahrungsaufnahme (Vergoni & Bertolini, 2000). Störungen im Melanokortinsystem können deshalb zu erheblichen Störungen in der Regulation des Körpergewichtes führen.

1.4.1 Störungen der Funktion des Melanokortin-4 Rezeptors (MC4R)

Das Gen des Melanokortin-4 Rezeptors (*MC4r*) wurde erstmals 1993 kloniert (Gantz *et al.*, 1993a; Mountjoy *et al.*, 1994). MC4R gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die über eine Aktivierung der Adenylat-Cyclase die cAMP-Second-Messenger-Signaltransduktion in Gang setzen (Haskell-Luevano & Monck, 2001). Sie kommen ausschließlich im Gehirn vor, hier vor allem in Neuronen des DMN, LH und PVN, aber auch in extrahypothalamischen Gehirngebieten wie Thalamus, Cortex und Stammhirn (Gantz *et al.*, 1993b; Mountjoy *et al.*, 1994). Eine Aktivierung des MC4R durch seinen natürlichen Liganden α -MSH führt zu einer reduzierten Futteraufnahme und einem Anstieg des Energieumsatzes (Satoh *et al.*, 1998). α -MSH wirkt über MC4R im DMN hemmend auf die NPY Expression in diesem Kerngebiet (Kesterson *et al.*, 1997).

Untersuchungen an A^y -Mäusen bestätigten die Annahme einer Beteiligung des MC4R an der Gewichtsregulation. Das *Agouti*-Syndrom ist die am längsten bekannte Form der Adipositas bei der Maus (Wolff *et al.*, 1978). Das ektopisch exprimierte *Agouti*-Protein der A^y -Mäuse ist nicht nur ein endogener Antagonist des für die Pigmentation essentiellen Melanokortin-1 Rezeptors (MC1R), sondern auch des MC4R (Lu *et al.*, 1994). Die durch das Protein hervorgerufene Blockade des MC4R wird als Ursache für die Adipositas der A^y -Mäuse angesehen. Die Generierung der *MC4r*-KO Maus bestätigte die entscheidende Rolle des MC4R in der Kontrolle der Nahrungsaufnahme (Huszar *et al.*, 1997).

1.4.2 Die Melanokortin-4 Rezeptor „Knockout“ Maus

Die physiologischen Konsequenzen eines MC4R-Defektes wurden unter der Verwendung der *MC4r*-KO Maus untersucht. In der Erstbeschreibung dieses Mäusestammes durch Huszar *et al.* (1997) wurden Daten von homozygoten (-/-) Tieren, die diesen Gendefekt auf beiden Allelen tragen, heterozygoten (+/-) Tieren, die nur ein defektes Allel besitzen, und Wildtypmäusen (+/+) erhoben. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff "MC4R-defiziente Maus" dem der *MC4r*-KO Maus vorgezogen, da in dieser Ausdrucksweise die heterozygote Form des MC4R-Defektes eingeschlossen wird.

1.4.2.1 Phänotypische Merkmale der MC4R-defizienten Maus

Die Beobachtung der Entwicklung von Körpergewicht und Körperlänge führte zu der Postulierung einer spät einsetzenden Adipositas bei diesem Mäusestamm ebenso wie bei den A^y -Mäusen. Huszar *et al.* (1997) zeigten, dass in den ersten vier Lebenswochen die Mäuse aller drei Genotypen² keinen nennenswerten Unterschied im Körpergewicht aufwiesen, ab einem Alter von 5 Wochen (40 Tage) hatten männliche und weibliche -/- Tiere jedoch ein höheres Körpergewicht als gleichaltrige Wildtypen. Dieser Unterschied im Körpergewicht wurde mit zunehmendem Alter noch deutlicher, zusätzlich wiesen die +/- Weibchen und Männchen ein Körpergewicht auf, das zwischen den -/- und den +/+ Mäusen lag ($+/+ < +/- < -/-$). Die Körpergewichtsregulation der MC4R-defizienten Mäuse zeigt somit einen Gendosis³-abhängigen Effekt (Huszar *et al.*, 1997). Spätere Untersuchungen bestätigten diesen Gendosis-abhängigen Effekt lediglich bei männlichen Tieren ($+/+ < +/- < -/-$), bei den Weibchen unterschieden sich die +/- Tiere jedoch nicht von den Wildtypen ($+/+ = +/- < -/-$). Der genetische Defekt am *MC4r* verhielt sich bei den Weibchen dieser Studie rezessiv. Der bei den Weibchen fehlende Gendosis-Effekt könnte auf eine leichte Variation des genetischen Hintergrundes der zur Klonierung verwendeten Stammzellen zurückzuführen sein (Chen *et al.*, 2000). Huszar *et al.* (1997) zeigten, dass auch das Längenwachstum durch den MC4R beeinflusst wird. Untersuchungen an adulten Tieren zeigten, dass -/- Mäuse eine deutlich größere Körperlänge aufwiesen als +/-, die wiederum länger als +/+ Tiere waren.

² In dieser Arbeit wird der allgemeine Begriff "Genotyp" für den Genotyp eines Tieres am *MC4r*-Lokus verwendet.

³ Das Melanokortinrezeptor-Gen (*MC4r*) kommt in dem verwendeten Zuchtstamm in zwei allelen Formen vor. *MC4r* steht für das defekte Allel bei hetero (+/-) und homozygoten (-/-) Trägern der Mutation. In Anlehnung an die englische Ausdrucksweise wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen des Gendefektes am *MC4r* in Abhängigkeit von der Anzahl der defekten Allele (0, 1, 2) als „Gendosis“-abhängige Effekte bezeichnet.

Eine parallel zu dieser Arbeit laufende Doktorarbeit⁴, in der Tiere mit demselben genetischen Hintergrund wie bei Huszar *et al.* (1997) verwendet wurden, zeigte, dass die exzessive Fettdeposition bei den -/- Tieren schon in der Absetzphase vom Muttertier beginnt (Weide *et al.*, 2003). Obwohl sich bis zu einem Alter von 35 Tagen der Genotypunterschied nicht auf das Lebendgewicht der MC4R-defizienten Mäuse auswirkt, konnte gezeigt werden, dass der Körperfettgehalt der -/- Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits signifikant höher als bei Heterozygoten und Wildtypen ist. Bei 56 Tage alten Tieren ist nicht nur der Körperfettgehalt der -/- Tiere doppelt so groß wie der der +/- Mäuse, der Körperfettgehalt der +/- Mäuse ist ebenfalls 20% größer als bei den Wildtypen (+/+ < +/- < -/-). Bietet man Tieren nach dem Absetzen eine attraktive hochkalorische Zusatznahrung an, so zeigen sie ab einem Alter von 35 Tagen eine höhere Fettdeposition als die normalernährte Kontrollgruppe. Dabei sind vor allem die -/- Tiere von der exzessiven Körperfettzunahme betroffen. Ab einem Alter von 21 Tagen wurde ein signifikanter Geschlechtseinfluss gezeigt ($P < 0.05$), jedoch wurde keine signifikante Interaktion zwischen dem Genotyp und dem Geschlecht gefunden.

1.4.2.2 Veränderungen der physiologischen Parameter bei MC4R-defizienten Mäusen

Eine Quantifizierung der aufgenommenen Futtermenge zeigt, dass -/- Tiere wesentlich mehr Futter zu sich nehmen als +/+ Tiere. Neben einer Glukosämie und Insulinämie weisen die -/- Mäuse auch eine Hyperleptinämie auf. Dies lässt darauf schließen, dass die Adipositas nicht durch einen Defekt in der Leptinproduktion verursacht wird. Die zentrale oder *ip* Verabreichung von Leptin führt bei adulten -/- Tieren nicht zu einer Reduktion der Futteraufnahme und zeigt dadurch eine Leptinresistenz dieser Mäuse auf (Marsh *et al.*, 1999b). Da jüngere, noch normalgewichtige -/- Tiere jedoch auf eine Verabreichung von Leptin reagieren, handelt es sich bei der Leptinresistenz der adulten Tiere vermutlich um einen sekundären Effekt der Adipositas. Die metabolische Rate (MR) von -/- Tieren, die ein signifikant höheres Körpergewicht aufweisen als +/+ Tiere, ist höher als die der normalgewichtigen Kontrolltiere, bzw. genauso hoch wie die von adipösen C57Bl/6 Mäusen (Chen *et al.*, 2000). Betrachtet man die MR jedoch unter Berücksichtigung der Körpermasse, so liegt die MR der -/- Tiere niedriger als die der anderen beiden Gruppen. Die Veränderung der massespezifischen MR ist also auf eine erhöhte Körpermasse und nicht auf den Defekt des MC4R zurückzuführen (Chen *et al.*, 2000).

⁴ K. Weide, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

Der Plasmaleptingehalt ist auch bei den MC4R-defizienten Mäusen eng mit dem Körperfettgehalt korreliert. Genotypunterschiede in Plasmaleptinspiegel und Körperfettgehalt lassen sich ab einem Alter von 35 Tagen nachweisen, jedoch kann kein Genotypeinfluss auf die Korrelation zwischen diesen beiden Parametern gezeigt werden. Die vermehrte Fettdeposition dieses Mäusestammes ist also nicht mit einem überproportionalen Anstieg des Plasmaleptinspiegels verbunden, wie dies bei Tieren mit einem Leptinrezeptordefekt der Fall ist (Christ *et al.*, 2000).

1.4.3 Haploinsuffizienz des *MC4r* beim Menschen

Die Relevanz des MC4R-defizienten Mausmodells für die Untersuchung der menschlichen Adipositas wurde 1998 durch die Entdeckung einer analogen Mutation in einem extrem adipösen Patientenkollektiv bestätigt (Vaisse *et al.*, 1998; Yeo *et al.*, 1998; Chagnon *et al.*, 2003; Hinney *et al.*, 1999).

Ende 1998 beschrieben Yeo *et al.* und Vaisse *et al.* unabhängig voneinander zwei Mutationen im *MC4r*, die funktionell zu einer Haploinsuffizienz führen. Ein Jahr später fanden zwei andere Forschungsgruppen weitere Patienten mit heterozygoten *MC4r*-Mutationen (Gu *et al.*, 1999; Hinney *et al.*, 1999). In den letzten Jahren wurden weitere Mutationen, hauptsächlich bei Menschen in Europa und in den USA, beschrieben (Marti *et al.*, 2003). Zurzeit werden in der „Human Obesity Gene Map“ 29 verschiedene Mutationen des *MC4r* mit der Lokalisation 18q22 in insgesamt 73 Veröffentlichungen aufgeführt (Chagnon *et al.*, 2003).

Bei den Untersuchungen des Patientenkollektivs konnten einige Parallelen zu dem MC4R-defizienten Mausmodell gezogen werden:

- 1) Die auf einem MC4R-Defekt beruhende Adipositas entwickelt sich bereits im frühen Alter (Yeo *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 2003; Vaisse *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 1999).
- 2) Weibliche Mutationsträger sind in der Regel stärker adipös als männliche Patienten (Hebebrand *et al.*, 2001). Es wird sogar von männlichen Mutationsträgern mit normalem Körpergewicht berichtet (Vaisse *et al.*, 2000).
- 3) Yeo *et al.* (1998) berichten von auffallendem Längenwachstum ihrer Patienten.

Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch Unterschiede zwischen den Symptomen der betroffenen Menschen und dem genetischen Mausmodell: Die Patienten weisen einen physiologischen Blutglukose- und Plasmalipidspiegel auf (Vaisse *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 2003) und sind in ihrer sexuellen Entwicklung und Fertilität nicht beeinträchtigt. Hinney *et al.* (1999) zeigten, dass diese Patienten trotz Adipositas weder Diabetes mellitus Typ 2 noch eine Hypertonie aufweisen. Die Betroffenen zeigen ein gynoides Fettverteilungsmuster. Im Gegensatz zu anderen monogenetischen Adipositasformen weisen Patienten mit MC4R-Defekt keine weiteren phänotypischen Merkmale auf (Hebebrand *et al.*, 2001).

Man kann davon ausgehen, dass ca. 3-5% der Patienten mit einem BMI > 40 (Barsch *et al.*, 2000), bzw. 4% der Betroffenen mit frühmanifestester extremer Adipositas (Vaisse *et al.*, 2000) eine Mutation des *MC4r* aufweisen. Bei Normalgewichtigen konnten bislang keine funktionell relevanten Mutationen des *MC4r* nachgewiesen werden (Hinney *et al.*, 1999). Neben dem haploinsuffizienten *MC4r*-Defekt wurde bisher nur eine Familie gefunden, in der fünf homozygote *MC4r*-Mutationsträger vorkommen (Farooqi *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu Mutationen des *MC4r* sind die übrigen monogen bedingten Formen der Adipositas klinisch nicht relevant. Eine Mutation des *ob*-Gens wurde bisher erst in zwei Familien (Montague *et al.*, 1997; Strobel *et al.*, 1998), eine Mutation des *Lepr* lediglich in einer Familie beschrieben (Clément *et al.*, 1998). Eine weitere monogenetisch bedingte Adipositasform durch einen Defekt im POMC-Gen konnte in zwei Fällen nachgewiesen werden (Krude *et al.*, 1998).

1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die Neuropeptidexpression von NPY und POMC im Hypothalamus von MC4R-defizienten Mäusen anhand von *in situ* Hybridisierung untersucht. Die Versuchstiere beiderlei Geschlechts waren 21, 35 und 56 Tage sowie 9 Monate alt, es wurden sowohl heterozygote und homozygote MC4R-defiziente Tiere als auch Wildtypen untersucht. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde werden durch Daten der AGRP und CART Expression im ARC derselben Versuchstiergruppe, die im Rahmen einer Diplomarbeit⁵ erhoben und von mir weiter bearbeitet wurden, ergänzt. Eine Quantifizierung der Neuropeptidexpression im ARC erfolgte durch die Auswertung der, mittels radioaktiver *in situ* Hybridisierung erhobenen, autoradiographischen Befunde. Eine erste Beurteilung der Expression im DMN und VMN wurde

⁵ C. Pauli, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

ebenfalls an Hand der autoradiographischen Resultate vorgenommen. Um eine Quantifizierung der selektiven NPY Expression im DNM und VMN durchzuführen, wurde eine nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung an parallelen Schnitten angefertigt. Hierdurch konnte ein direkter methodischer Vergleich zwischen radioaktiver und nicht-radioaktiver *in situ* Hybridisierung gezogen werden.

In dieser Arbeit werden die zellbiologischen Ergebnisse mit systemphysiologischen Befunden zum Körperfettgehalt oder Plasmaleptinspiegel derselben Versuchstiere korreliert. Ferner gibt die statistische Auswertung der Daten einen Einblick in die Regulation der Nahrungsaufnahme. Bisher wurden die Konsequenzen einer genetischen Ausschaltung des MC4R fast ausschließlich an adulten Mäusen untersucht. In dieser Arbeit werden deshalb neben den adulten vor allem junge Tiere in der Anfangsphase der exzessiven Fettdeposition untersucht, da sich bei einem erwachsenen Tier die Ursachen nur schwer von den Folgen einer Adipositas unterscheiden lassen. Die Versuche sollen Aufschluss über eine mögliche Veränderung der Neuropeptid-expression in Abhängigkeit von Genotyp, Geschlecht und Alter der Tiere geben. Die Analyse heterozygoter MC4R-defizienter Mäuse erlangt dabei eine besondere Bedeutung, da beim adipösen Menschen bis jetzt überwiegend heterozygote Mutationsträger des *MC4r*-Gen gefunden wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an MC4R-defizienten Mäusen und Wildtypen aus der Zuchtkolonie des W.G. Kerckhoff-Institut in Bad Nauheim durchgeführt. Diese Zucht wurde 1999 durch Paarung von je vier heterozygoten Männchen und Weibchen aufgebaut, die uns freundlicherweise von Dennis Huszar, Millenium Pharmaceuticals, Inc., Massachusetts, USA zur Verfügung gestellt wurden. Die Tiere wurden bei 25°C in einem Licht/Dunkel-Zyklus von 12:12 h gehalten, die Dunkelphase begann um 15:00 Uhr. Die weiblichen Zuchtmäuse saßen zu zweit, die männlichen Mäuse alleine in Makrolon-Käfigen (Typ 2, Becker & Co GmbH, Castrop-Rauxel, BRD) auf Holzgranulatstreu (Altromin, Lage, BRD). Zur Paarung wurden Männchen und Weibchen über einen Zeitraum von 14 Tagen zusammengesetzt, anschließend wurden die tragenden Weibchen isoliert. Die Welpen wurden 21 Tage bei dem Muttertier gelassen und anschließend nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von zwei bis vier Tieren gehalten. Bis zum Alter von 10 Tagen ernährten sich die Welpen ausschließlich von Muttermilch. Ab der dritten Lebenswoche wurde zusätzlich pelletiertes Futter (Zuchtfutter für Ratten und Mäuse, Altromin 1314, Altromin, Lage, BRD) aufgenommen, welches zur leichteren Verfügbarkeit für die Welpen auf den Käfigboden gelegt wurde. Nach dem Absetzen erhielten die Tiere ausschließlich Pellets und Wasser *ad libitum*.

2.2 Versuchsdurchführung

2.2.1 Bestimmung der Neuropeptidexpression im Nukleus arcuatus

Die Bestimmung der Expression von Neuropeptid Y (NPY), Pro-Opiomelanokortin (POMC), *Agouti*-related protein (AGRP) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART) erfolgte mittels radioaktiver *in situ* Hybridisierung. Es wurden für NPY und POMC jeweils vier (I1-I4)⁶ und für AGRP und CART jeweils drei (I1-I3)⁷ *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. In jeder *in situ* Hybridisierung wurden Wildtypen (+/+), heterozygote (+/-) und homozygote (-/-) MC4R-defiziente Mäuse unterschiedlichen Alters untersucht.

⁶ Die *in situ* Hybridisierungen (NPY, POMC) wurden unter Mithilfe von K. Moar, S. Eiden und C. Pauli im Rowett Research Institute, Aberdeen, Schottland durchgeführt.

⁷ Die Versuche mit AGRP und CART wurden von C. Pauli und K. Moar im Rowett Research Institute, Aberdeen, Schottland durchgeführt (Diplomarbeit C. Pauli, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg).

In I1 und I2 wurden weibliche, in I3 männliche Tiere und in I4 Weibchen und Männchen gemeinsam untersucht. Die Verteilung der Tiere in den verschiedenen *in situ* Hybridisierungen (I1-I4) ist in Tab. I und II gezeigt. Alle Versuchstiere der I4 wurden zusätzlich in einer nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung verwendet⁸.

Tabelle I

NPY						
Anzahl [N] der Versuchstiere						
Gen	d21	d35	d56	9Mo	w	m
I1						
+/+		2	2		4	
+/-		3	3		6	
-/-		2	4		6	
gesamt		7	9		16	
I2						
+/+		6	3	3	12	
+/-		2	3	3	8	
-/-		5	5	3	13	
gesamt		13	11	9	33	
I3						
+/+	3	3	3	1		10
+/-	3	4	3	1		11
-/-	3	3	3	3		12
gesamt	9	10	9	5		33
I4						
+/+			4	4	2	6
+/-			5	5	4	6
-/-		3	4	5	7	5
gesamt		3	13	14	13	17

POMC						
Anzahl [N] der Versuchstiere						
Gen	d21	d35	d56	9Mo	w	m
I1						
+/+		2	2		4	
+/-		3	3		6	
-/-		2	4		6	
gesamt		7	9		16	
I2						
+/+		5	4	3	12	
+/-		4	4	3	11	
-/-		5	4	3	12	
gesamt		14	12	9	35	
I3						
+/+	3	3	2	2		10
+/-	3	4	3	1		11
-/-	3	3	3	2		11
gesamt	9	10	8	5		32
I4						
+/+			6	6	6	6
+/-			4	4	5	3
-/-		3	6	6	8	7
gesamt		3	16	16	19	16

AGRP						
Anzahl [N] der Versuchstiere						
Gen	d21	d35	d56	9Mo	w	m
I1						
+/+		2	2		4	
+/-		4	3		7	
-/-		4	4		8	
gesamt		10	9		19	
I2						
+/+		6	4	2	12	
+/-		3	4	3	10	
-/-		5	5	2	12	
gesamt		14	13	7	34	
I3						
+/+		3	3	3		9
+/-		4	3	2		9
-/-		3	3	2		8
gesamt		10	9	7		24

CART						
Anzahl [N] der Versuchstiere						
Gen	d21	d35	d56	9Mo	w	m
I1						
+/+		2	2		4	
+/-		4	3		7	
-/-		4	4		8	
gesamt		10	9		19	
I2						
+/+		5	4	3	12	
+/-		4	4	3	11	
-/-		5	5	3	13	
gesamt		14	13	9	36	
I3						
+/+		3	2	3		8
+/-		4	3	3		10
-/-		3	3	2		8
gesamt		10	8	7		26

Tabelle I: Anzahl [N] der Tiere, die zur radioaktiven Bestimmung der NPY-, POMC-, AGRP- und CART Expression) im Nukleus arcuatus verwendet werden. Die Tierzahlen sind nach *in situ* Hybridisierungen (I1-I4), Genotypen (Gen), Altersgruppen und Geschlecht getrennt. Wildtypen: +/+; Heterozygote: +/-; Homozygote: -/-; d21: 21 Tage alte Tiere; d35: 35 Tage alte Tiere; d56: 56 Tage alte Tiere; 9Mo: 9 Monate alte Tiere; w: Weibchen; m: Männchen.

⁸ Die nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung wurde unter Mithilfe von Q. Zhang, Frankfurt a. M. durchgeführt.

Tabelle II

NPY						POMC					
Anzahl [N] der Versuchstiere						Anzahl [N] der Versuchstiere					
Genotyp	d35	d56	9Mo	w	m	Genotyp	d35	d56	9Mo	w	m
I4						I4					
+/+		6	7	7	6	+/+		5	8	6	7
+/-		4	6	4	6	+/-		5	4	5	4
-/-	3	4	5	7	5	-/-	3	3	6	7	5
gesamt	3	14	18	15	17	gesamt	3	13	19	18	16

Tabelle II: Anzahl [N] der Tiere, die zur nicht radioaktiven Bestimmung der NPY- und POMC Expression im Nukleus arcuatus in I4 verwendet wurden. Die Tiere sind nach Genotypen (Gen), Altersgruppen und Geschlecht getrennt. Wildtypen: +/+; Heterozygote: +/-; Homozygote: -/-; d21: 21 Tage alte Tiere; d35: 35 Tage alte Tiere; d56: 56 Tage alte Tiere; 9Mo: 9 Monate alte Tiere; w: Weibchen; m: Männchen.

2.2.2 Physiologische Auswertung

Von den Tieren, die in I1-I4 eingesetzt wurden, wurden ergänzend physiologische Daten wie Körpergewicht, Körperfettgehalt, Feuchtmasse, Wassergehalt, Trockenmasse, Plasmainsulinspiegel und Plasmaleptingehalt ausgewertet, die im Rahmen einer parallel laufenden Dissertation⁹ bestimmt worden waren. Um eine entsprechende Anzahl von 9 Monate alten Tieren für die Auswertung der physiologischen Daten zu erhalten, wurde zusätzlich zu den für die *in situ* Hybridisierung verwendeten Tieren eine weitere Gruppe herangezogen (Tabelle III).

Tabelle III

Anzahl [N] der Versuchstiere (m)			Anzahl [N] der Versuchstiere (w)		
9Mo	Genotyp	N	9Mo	Genotyp	N
	+/+	13		+/+	13
	+/-	23		+/-	28
	-/-	11		-/-	17
gesamt		47	gesamt		58

Tabelle III: Anzahl (N) aller 9 Monate (9Mo) alten Tiere nach Geschlecht und Genotyp getrennt. Wildtypen: +/+; Heterozygote: +/-; Homozygote: -/-. w: Weibchen; m: Männchen.

⁹ K. Weide, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

2.3 Präparationsmethoden¹⁰

2.3.1 Tötung der Versuchstiere und Plasmagewinnung

Alle Versuchstiere wurden eine Stunde vor Beginn der Dunkelphase unter möglichst stressfreien Bedingungen getötet. Zum jeweiligen Tötungszeitpunkt wurden die Mäuse für etwa 30 Sekunden mit CO₂ betäubt und anschließend dekapitiert. Das aus dem Torso austretende Blut wurde in einem zuvor gewogenen Eppendorfcup (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wessling-Berzdorf, BRD) mit Heparin-Natrium (Liquemin 5000, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, BRD) aufgefangen und eisgekühlt. Die Heparinmenge richtete sich nach der zu erwartenden Blutmenge, sie betrug maximal 10% des Endvolumens. Das Plasma wurde durch Zentrifugieren bei 4°C und 3500 U/min für 15 min von den Blutzellen getrennt, abpipettiert und aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Blutplasma bei -80°C gelagert. Durch Wiegung der einzelnen Blutfraktionen (Zellbestandteile und Plasma) wurde die Heparinverdünnung bestimmt und die Werte der Plasmahormonmessungen mit dem ermittelten Faktor korrigiert.

2.3.2 Präparation der Gehirne

Die Präparation der Gehirne erfolgte parallel zur Blutentnahme unmittelbar nach Dekapitierung der Tiere. Die Kopfhaut wurde entfernt und die Schädeldecke mit einer spitzen Schere kreisförmig vom Foramen magnum ausgehend nach rostral und von dort über die Mediane zurück zum Foramen magnum eröffnet, ohne das Gehirn zu verletzen oder zu quetschen. Die Meningen wurden entfernt und das Gehirn mit einem Spatel aus dem Schädel gelöst. Nach Durchtrennung der Nervi optici und Nervi trigemini wurde es vorsichtig mit dem Cortex nach unten auf eine Glasplatte gelegt. Anschließend wurde das Gehirn mit einer Pinzette in pulverisiertes Trockeneis gelegt und bis zum vollständigen Durchfrieren bedeckt. Mit Parafilm M[®] (Pechiney Plastic Packaging Inc., Wisconsin, USA) und Alufolie vor Austrocknung geschützt, wurde es bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.3.3 Eviszeration zur Bestimmung der Körperzusammensetzung

Nach dem Töten wurde den Tieren der Magen-Darm-Trakt entnommen, um den Einfluss von Kot und Futterresten auf die Bestimmung der Körperzusammensetzung zu vermeiden. Nach dem Eröffnen der Bauchhöhle in der Linea alba wurde die Milz von der großen Kurvatur des Magens

¹⁰ Die Präparation der Tiere wurde unter Mithilfe von Mitgliedern der AG Schmidt, Bad Nauheim durchgeführt.

entfernt und der Ösophagus cranial der Cardia sowie das Ligamentum hepatogastricum durchtrennt. Der Magen und der craniale Anteil des Dünndarms wurden freipräpariert. Die Harnblase wurde eröffnet und entleert. Anschließend wurde der restliche Darm vom Gekröse abgetrennt und der gesamte Magen-Darm-Trakt entnommen. Bei der Präparation wurde sorgfältig darauf geachtet, dass alles Fettgewebe im Tierkörper verblieb.

2.3.4 Bestimmung der Körperzusammensetzung

Nach der Eviszeration wurden die Tierkörper gewogen und so die Feuchtmasse unter Berücksichtigung des zuvor entnommenen Blutes bestimmt. Da Variationen im Füllungszustand des Magen-Darm-Traktes wegfallen, stellt die Feuchtmasse eine sehr genaue Bezugsgröße für die Berechnung der prozentualen Körperzusammensetzung dar. Diese wurde in einem, in der Arbeitsgruppe etablierten Standardverfahren (Markewicz *et al.* 1993; Olbort, 1998) bestimmt. Die Tierkörper wurden in einem Trockenschrank (Memmert, Schwalbach, BRD) bei 75°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wodurch Körperwasser und Trockengehalt der Mäuse bestimmt werden konnten. Anschließend wurden die mumifizierten Körper sorgfältig in stabiles, fettfreies Filterpapier eingewickelt, welches durch Heftklammern verschlossen wurde. Durch stumpfen Druck wurden die Körper in der Hülle zerkleinert und in einem Extraktionsapparat nach Soxhlet (VWR International GmbH, Darmstadt, BRD) einer 24-stündigen Chloroform-Extraktion (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD) unterzogen. Die vollständig entfetteten Körper wurden aus dem Filterpapier ausgepackt und erneut bis zur Gewichtskonstanz in den Trockenschrank gelegt. Das Endgewicht stellte die fettfreie Trockenmasse (FFDM = fat-free dry mass) dar. Zusätzlich wurden die prozentualen Anteile der Körperfettmasse und des Körperwassers an der Feuchtmasse errechnet.

2.3.5 Anfertigen der Gehirnschnitte¹¹

Die nach der Tötung der Tiere entnommenen und bei -80°C gelagerten Gehirne wurden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (HM 500 O, Microm International GmbH, Walldorf, BRD) in 20 µm dicke Frontalschnitte geschnitten. Zuvor wurden Kleinhirn und Hirnstamm im Bereich der Lamina tecti vom Großhirn abgetrennt und das Großhirn auf die entstandene Schnittfläche unter Beachtung der Symmetrie aufgeblickt. Die Schnittführung erfolgte von rostral nach caudal. Der Gehirnblock wurde so in das Mikrotom eingespannt, dass das Messer den lateralen Großhirnanteil zuerst durchschnitt. Auf diese Weise blieb die ventral des Gehirns gelegene

¹¹ Das Schneiden der Gehirne wurde unter Mithilfe von D. Fuchs und C. Pauli durchgeführt.

empfindliche Region des Hypothalamus besser erhalten. Mit dem Auftreten des ARC, entsprechend Bregma -1,22 mm, wurde mit dem Aufnehmen der Schnitte begonnen (Figure 41, Franklin & Paxinos, 1997), beendet wurde es vor dem ventralen Ende des 3. Ventrikels, entsprechend Bregma -2,54 mm (Figure 52, Franklin & Paxinos, 1997). Es wurden von jedem Gehirn Serien auf 8 Objektträgern angefertigt, auf jedem Objektträger, die zuvor mit Gelatine und Poly-L-Lysin beschichtet worden waren (siehe Anhang Punkt 1.3.1), befanden sich nach Ende der Schnittaufnahme acht Schnitte. Die Objektträger wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.4 Analyseverfahren

2.4.1 Molekularbiologische Genotypbestimmung¹²

2.4.1.1 *Isolierung und Aufbereitung der DNA aus Gewebeproben*

Zur DNA Gewinnung wurde jedem Versuchstier am zweiten Lebenstag ein ca. 0,5 cm langes Gewebestück an der Schwanzspitze entnommen. Der Verdau der Proben erfolgte über Nacht bei 55°C auf dem Wasserbad-Schüttler mit Proteinase K (Qiagen GmbH, Hilden, BRD), die Aufbereitung wurde am nächsten Tag mit dem QIAmp DNA Mini Kit 250 (Qiagen GmbH, Hilden, BRD) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Ausfällung der DNA mit absolutem Ethanol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD). Nach mehreren Reinigungsschritten wurde die DNA in einer Pufferlösung aufgefangen und konnte in dieser Form in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt werden.

2.4.1.2 *Polymerase- Kettenreaktion (PCR)*

Von jedem Tier wurden 3 µl DNA-Lösung mit 22 µl Master-Mix versetzt. Der Master-Mix bestand aus 13,75 µl H₂O (Millipore, steril), 2,5 µl PCR-Puffer 10x, 2 µl MgCl₂ (2 mM), 0,5 µl dNTP-Mix (200 µM/dNTP), 1 µl MC4 F3 Primer (4 µM), 1 µl MC4 R1 Primer (4 µM), 1 µl PGK R3 Primer (4 µM) sowie 0,25 µl Taq-Polymerase. Zur Unterscheidung der Genotypen wurden verschiedene Primer mit folgenden Sequenzen verwendet:

¹² Die PCR wurde von D. Fuchs und K. Weide durchgeführt.

MC4 F3 (Forward) Primer: 5'-GGA AGA TGA ACT CCA CCC ACC- 3'

MC4 R1 (Revers) Primer: 5'-GAC GAT GGT TTC CGA CCC ATT- 3'

PGK R3 Primer: 5'-TTC CCA GCC TCT GAG CCC AGA- 3'

Um die Hybridisierung des Primers an die Zielsequenz gegenüber der Rehybridisierung der getrennten Einzelstränge zu begünstigen, wurden die Primer im Überschuss zugesetzt. MC4 F3 und MC4 R1 Primer bilden Start- und Endpunkt des Wildtyp *MC4r*, während MC4 F3 und PGK R3 Primer das "Neo"-Gen (das klonierte *MC4r*, das den funktionell defekten MC4R codiert) markieren, welches unter Kontrolle des Phosphoglycerinkinase1 (PGK1)-Promotors bei den homozygoten MC4R-defizienten Mäusen an die Stelle der für die Genese essentiellen *MC4r*-Sequenzen tritt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (PerkinElmer Biosystems, Weiterstadt, BRD) durchgeführt. Die Vermehrung der DNA erfolgte in drei Schritten, die jeweils 45 Sekunden dauerten: Die Denaturierung und Trennung der DNA in Einzelstränge (*melting*) erfolgte bei 94°C. Im zweiten Schritt wurden die Primer-Oligonukleotide bei 64°C hybridisiert (*annealing*). Anschließend wurde die Replikation bei 72°C durchgeführt (*synthesis*). Dieser Zyklus wurde 40-mal wiederholt.

2.4.1.3 Elektrophorese

Zum Auftrennen der DNA-Fragmente wurde zu jedem Amplifikat 1,2 µl Farbpuffer gegeben. Anschließend wurden jeweils 10 µl Probe auf ein 2,5%iges Agarose-Gel (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD) aufgetragen. Zusätzlich wurde 1,5 µl Marker (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD) in 10 µl TBE 0,5x Puffer gegeben, mit dem Farbstoff versetzt und auf das Gel aufgetragen. Bei 150 V wurden die Amplifikate aufgetrennt. Danach wurde das Gel für 15 min in Ethidiumbromid (5 µl Ethidiumbromid 10% (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD) in 120 ml TBE 0,5x Puffer) gewaschen. Unter UV-Licht bei 366 nm erfolgte die Auswertung auf dem Transilluminator. Die Identifizierung der einzelnen Genotypen erfolgte über die Länge der unterschiedlichen DNA-Fragmente. Die DNA von Wildtyp-Mäusen ist als eine Bande mit 313 bp erkennbar, die DNA der homozygoten Tiere stellt sich als 405 bp-Bande dar. Heterozygote Tiere erkennt man durch das Vorhandensein beider DNA-Banden.

2.4.2 Radioimmunoassay zur Bestimmung der Hormonkonzentration im Blutplasma

2.4.2.1 *Allgemeines zur Durchführung eines Radioimmunoassays*

Die quantitative Bestimmung von Hormonen in Blutplasma und anderen biologischen Flüssigkeiten kann mittels Radioimmunoassay (RIA) erfolgen. Die Grundlage dieses immunologischen Testverfahrens ist eine hochaffine Antigen-Antikörperreaktion. Die Sensitivität des Verfahrens wird durch die „non-equilibrium“-Methode (Chard 1982) erhöht. Dabei werden die gebildeten Antigen-Antikörperkomplexe nach einer Präinkubationszeit mit radioaktiv markiertem Antigen (*Tracer*) bekannter Konzentration versetzt. Das radioaktiv markierte Hormon konkurriert mit dem unmarkierten Hormon um die Bindungsstellen der Antikörpermoleküle (γ -Immunoglobuline), es kommt zu einer kompetitiven Austauschreaktion.

2.4.2.2 *Bestimmung der Leptinkonzentration im Blutplasma*

Die Bestimmung des Plasmaleptinspiegels der MC4R-defizienten Mäuse und der C57Bl/6J-Mäuse wurde mit einem kommerziellen Maus-Leptin RIA Kit (Linco Research Inc., St. Charles, USA) durchgeführt¹³. Für jeden Assay wurde eine Standardkurve erstellt, die auf Doppelbestimmungen sieben verschieden konzentrierter Leptinstandards (0,5-20 ng/ml, Bestandteil des Kits) beruhte. Zusätzlich wurden drei Kontrollansätze hergestellt, der T_0 -Ansatz enthielt nur den *Tracer* (100 μ l [125]-Maus-Leptin), er gibt die eingesetzte Menge an Radioaktivität (100%) an und wurde als einzige Probe dem nachfolgend beschriebenen Trennungsverfahren nicht unterworfen. Der Non-Specific-Binding (NSB)-Ansatz setzte sich aus *Tracer* und Puffer zusammen, dieser Ansatz gibt den Prozentteil der unspezifischen Bindungen des *Tracer* an Puffer und Gefäßwänden an. Der NSB/ T_0 -Faktor lag bei allen durchgeführten RIAs unter den erforderlichen 5%. Die Leerprobe (B_0) enthielt *Tracer*, RIA-Puffer und Antikörper, jedoch kein unmarkiertes Antigen. Hierbei wird die maximale Bindung des *Tracer* an den Antikörper aufgezeigt, der empfohlene Wert liegt bei 45-50%. Die Konzentration an Radioligand und hormonspezifischem Antikörper wurde unter Berücksichtigung der höchstmöglichen Empfindlichkeit des RIAs gewählt.

Die bei -50 bis -80°C gelagerten Plasmaproben und Bestandteile des Kits wurden vor Versuchsbeginn bei Raumtemperatur aufgetaut. Die eingesetzte Menge an Plasma lag bei den 35 und 56 Tage alten Wildtypen und heterozygoten Mäusen bei 30 μ l und bei den homozygoten

¹³ Die RIA-Messungen wurden von R. Bender und D. Fuchs durchgeführt.

und den 9 Monate alten Tieren bei 10 µl, um zu gewährleisten, dass die ermittelten Leptinwerte im linearen Bereich der sigmoid verlaufenden Eichkurve lagen. Der B₀-Ansatz enthielt 200 µl Puffer und 100 µl Antikörper-Lösung, die Standards setzten sich aus 200 µl Puffer und 100 µl Leptin-Lösung zusammen, so dass alle eingesetzten Proben, die Standards und die Kontrollansätze ein Gesamtvolumen von 300 µl hatten.

Nach dem Mischen der Probenröhrchen folgte die Primärinkubation des Antikörper-Peptid-Gemisches für 24 Stunden bei 4°C. Anschließend wurde in jedes Probenröhrchen (auch in das bisher noch leere Röhrchen für den T₀-Ansatz) 100 µl in Puffer gelöstes [I¹²⁵]-Maus-Leptin pipettiert. Bei 4°C folgte die „non-equilibrium“-Inkubation. 24 Stunden später wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe von 1 ml Polyethylenglykol (PEG) ausgefällt und somit die ungebundene Radioaktivität von der gebundenen (IgG-[I¹²⁵]-Leptin) getrennt. Nach einer 20 min dauernden Inkubation bei 4°C und anschließender Zentrifugation für 20 min bei 3000 U/min wurde der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Radioaktivität im verbleibenden Protein-Pellet im Gammacounter quantitativ erfasst.

Für alle Tiere wurden mindestens zwei Messungen in separaten RIAs durchgeführt und der Mittelwert errechnet. Anhand der Eichkurve ließen sich die Rohwerte der Leptinkonzentration in ng/ml errechnen. Die Rohwerte mussten vor der statistischen Auswertung mit entsprechenden Verdünnungsfaktoren multipliziert werden, um die Menge der bei der Blutentnahme zugefügten Heparinlösung und des zugegebenen RIA-Puffers von der eingesetzten Plasmapmenge zu subtrahieren. Da die Probenmenge < 70 µl betrug, musste berücksichtigt werden, dass laut Herstelleranleitung und arbeitsgruppeneigener Verdünnungsreihen die arithmetisch ermittelten Werte höher lagen als bei 100 µl Probe. Entsprechend mussten in Vorversuchen Korrekturfaktoren bestimmt werden, um den die aus 10 µl bzw. 30 µl Plasma ermittelten Leptinwerte reduziert wurden. Des Weiteren bestehen zum einen Unterschiede in der Antikörper- und *Tracer*-qualität verschiedener Kits, zum anderen muss das Alter des Testkits berücksichtigt werden, da die messbare Radioaktivität mit der Lagerungsdauer abnimmt. Da die einzelnen Proben in verschiedenen RIAs gemessen wurden, wurde eine Dreifachbestimmung des Leptingehaltes eines bekannten Plasmapools durchgeführt, die die Variabilität zwischen verschiedenen RIAs (Inter-Assay Variabilität) und innerhalb eines RIAs (Intra-Assay Variabilität) beschreiben sollte. Aus den einzelnen Poolwerten wurde der Mittelwert bestimmt und anschließend auf Basis dieser Werte ein Mittelwert für die Pool-Leptinkonzentration aller RIAs berechnet. Für jeden einzelnen RIA wurde ein Korrekturfaktor bestimmt, mit dem die Messwerte multipliziert wurden. Der Mittelwert der Intra-Assay-Variabilität lag in der

vorliegenden Arbeit bei 1,9%; der Mittelwert der Inter-Assay-Variabilität aller zur Leptinbestimmung verwendeten RIAs bei 7,4%.

2.4.2.3 Bestimmung der Insulinkonzentration im Blutplasma

Der Gehalt an Plasmainsulin wurde mit Hilfe eines kommerziellen RIA-Kits (Serono Diagnostics, Freiburg, BRD) bestimmt¹⁴. Dieser Kit wurde ursprünglich zum Nachweis von humanem Insulin hergestellt, deshalb wurde statt des mitgelieferten humanen Standards ein Ratteninsulinstandard zur Erstellung der Eichkurve eingesetzt (Novo Industries Laboratories, Bagsvaerde, DK). Die Durchführung des RIAs erfolgte wie unter 2.4.2.2, außer dass die Proben hier nur einmal für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden, da Antikörper und *Tracer* zum gleichen Zeitpunkt zugefügt wurden. Die Ausfällung des gebundenen Antigens erfolgte anschließend mittels PEG.

Die Qualität des RIAs wurde durch das Mitmessen der unter 2.4.2.2 beschriebenen Kontrollansätze bestimmt. Die maximale Bindungsfähigkeit des *Tracer* lag zwischen 40 und 45%. Die Variabilität innerhalb des RIAs wurde durch eine Dreifachbestimmung des Insulingehaltes eines Plasmapools bestimmt. Die Intra-Assay-Variabilität lag in allen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Messungen unter 5%. Die Verdünnung des Blutplasmas mit Heparin und die Pufferverdünnung (es wurden Volumina zwischen 10 und 60 µl eingesetzt) wurden berücksichtigt und die Werte entsprechend korrigiert. Die Inter-Assay-Variabilität lag nach dieser Korrektur bei 11%. Durch die Verwendung des Rattenstandards kann es jedoch eventuell zu einer Verzerrung der Absolutwerte kommen, da sich die Bindungsaffinität des humanen Antikörpers an Ratten- bzw. Mausinsulin unterscheiden kann. Da man aber davon ausgehen kann, dass das relative Verhältnis der Insulinkonzentration nicht verfälscht ist, kann man vergleichende Untersuchungen zwischen Mäusegruppen ohne weiteres durchführen. Da bei zahlreichen Tieren nur 10 µl Probe eingesetzt wurden, die darin gemessene Insulinkonzentration mit einem Korrekturfaktor aber auf 100 µl Probe hochgerechnet wurde, erreichten die Werte dieser Tiere zum Teil sehr hohe Werte (> 100 µU/ml). Sofern diese Werte sich vor ihrer Korrektur im linearen Bereich der Eichkurve befanden, wurden die hochgerechneten Daten übernommen, auch wenn sie teilweise weit über 100 µU/ml lagen.

¹⁴ Die RIA-Messungen wurden von R. Bender und D. Fuchs durchgeführt.

Lagen die Werte jedoch vor der Korrektur bereits oberhalb des linearen Eichkurvenbereichs, so wurden die Daten durch einen Wert von 500 $\mu\text{U/ml}$ ersetzt, da eine quantitative Aussage bei Werten außerhalb des linearen Abschnitts der Eichkurve nicht möglich ist. Der Wert 500 $\mu\text{U/ml}$ wurde gewählt, da er sich im mittleren Bereich der hohen Werte befindet und die Regressionen oder statistischen Berechnungen dementsprechend nicht nach oben oder unten verzerrte.

2.4.3 In situ Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung stellt eine etablierte Methode zur Lokalisation und Semiquantifizierung von RNA-Sequenzen in Geweben und Zellen dar. Eine doppel- oder einsträngige Sonde radioaktiv oder nicht-radioaktiv markierter Nukleinsäuren bindet spezifisch an die komplementäre Zielsequenz. In dieser Arbeit wurde auf Basis einer RNA:RNA-*in situ* Hybridisierung die relative NPY-mRNA- und POMC-mRNA-Konzentration im Nukleus arcuatus (ARC) sowie in den ventromedialen (VMN) und dorsomedialen (DMN) Kernen des Hypothalamus von Mäusen bestimmt. Es wurde sowohl eine radioaktiv markierte ^{35}S -Sonde als auch eine nicht-radioaktiv markierte Digoxigenin-Sonde verwendet.

Die Behandlungsverfahren für AGRP und CART entsprechen denen von NPY und POMC weitestgehend. Aus diesem Grund sind in den folgenden Kapiteln nur die Verfahren für NPY und POMC beschrieben. Verwendete Chemikalien sind im Anhang aufgeführt.

2.4.3.1 Sonden

Die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten einsträngigen RNA-Sonden erfolgte durch den Einbau der fraglichen Sequenz in einen Vektor, der Transkriptionsstartpunkte für RNA-Polymerasen von Bakteriophagen enthält (zum Beispiel von T3, T7, Sp6). Zunächst wurde der Vektor mit einer Restriktionsendonuklease, die glatte oder überhängende 5'-Enden erzeugt, linearisiert. Anschließend folgt die *in vitro*-Transkription, dabei synthetisiert die entsprechende Polymerase in Gegenwart von markierten und unmarkierten Nukleotiden einzelsträngige RNA-Sonden (Ribosonden). Da diese Bakteriophagenpolymerasen eine hohe Promotorspezifität aufweisen, ist es möglich Ribosonden herzustellen, die wahlweise komplementär zum codierenden (*sense*) oder nichtcodierenden (*antisense*) Strang sind. Dies ermöglicht eine sinnvolle Negativkontrolle, um die Spezifität der *antisense*-Sonde zu überprüfen. Nach der Markierungsreaktion ist es ratsam, den Einbau der markierten Nukleotide zu überprüfen. Die

radioaktive Strahlung der Radionukleotide wurde in einem Szintillationszähler gemessen, der Einbau von Digoxigenin-markierten Nukleotiden wurde in einem Dot-Blot überprüft.

2.4.3.1.1 Transformation der Plasmide

Die cDNA-Plasmide pBLNPY-1, POMC, AGRP und CART wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. J. G. Mercer vom Rowett Research Institute (Aberdeen, UK) mit Genehmigung der Erstherrsteller zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pBLNPY-1 wurde ursprünglich von der Arbeitsgruppe um S. L. Sabol hergestellt (Higuchi *et al.*, 1988). Dieser Bluescribe M13(-)-Vektor enthält innerhalb der EcoRI-Region eine 511 bp große Insertion, die den größten Teil der cDNA des prepro-Neuropeptid Y von Ratten beinhaltet. Das POMC- und AGRP Plasmid wurde von Dr. A. W. Ross aus hypothalamischer cDNA des Sibirischen Hamsters kloniert (Mercer *et al.*, 2000). Das 344 bp POMC- und das 229 bp AGRP-cDNA-Fragment wurden in den pGEM-T-Easy Vektor (Promega Corporation, Madison, USA) eingebaut. Das POMC-Fragment ist zu 85% identisch mit dem Exon 3 des Maus-POMC. CART-cDNA (299 bp) wurde aus der RNA von GH3-Zellen hergestellt. Die Plasmide wurden jeweils in *E. Coli* Bakterien (JM 109) transformiert und durch deren Anzüchtung vervielfältigt. Die Transformation der Plasmide wurde in Zusammenarbeit mit Kim Moar und Julian Mercer durchgeführt.

2.4.3.1.2 Plasmidisolierung

In den mit 15% Glycerin versetzten und mit NPY und POMC transformierten *E. Coli* Bakterienstamm, gelagert bei – 80 °C, wurde je eine Pipettenspitze getaucht und diese jeweils in ein 50 ml Falconröhrchen, in das zuvor 5 ml flüssiges, mit Ampicillin (100 µg/ml) versetztes LB-Medium gefüllt worden war, gegeben und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der Plasmide mit dem Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, USA). Pro Bakterienkolonie wurden 2 Eppendorfcups mit je 1500 µl Bakterienansatz gefüllt und 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rest der Bakterienkolonie aus den Falconröhrchen auf die Eppendorfcups mit den bereits zentrifugierten Bakterienkolonien verteilt. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min wurde der Überstand so sauber wie möglich abpipettiert. In jedes Cup wurden 125 µl „Cell-Resuspension-Solution“ zugegeben und bis zur vollständigen Lösung vermischt. Die beiden Ansätze pro Plasmid wurden in je ein Eppendorfcup gefüllt und mit 250 µl „Cell-Lysis-Solution“ aufgefüllt. Nach 4-maligem Kippen der Cups wurden 10 µl „Alkaline Protease“ zugegeben. Nach erneutem 4-maligen Kippen wurde die Lösung 5 min

bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 350 µl „Neutralisation-Solution“ hinzu gegeben und die Ansätze für 10 min zentrifugiert. Zwei Säulen (Bestandteil des Kits) wurden auf ein Sammelgefäß gestellt und die Lysate auf je eine Säule aufgetragen. Nach 1 min Zentrifugieren wurde 750 µl „Wash-Solution“ zugegeben und wiederum für 1 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit 250 µl „Wash-Solution“ wiederholt. Nach jedem Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit aus dem Sammelgefäß entfernt. Im letzten Schritt wurde die Säule auf ein neues Eppendorfcup gestellt, 10 µl RNase-freies Wasser zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die isolierte, an die Säulenmembran gebundene Plasmid-DNA zu lösen. Durch Zentrifugieren sammelte sich die gelöste DNA am Boden des Eppendorfcups. Nach Entfernen der Säule wurde das Cup verschlossen und konnte bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden. Zur Konzentrationsbestimmung wurde jeweils 1 µl der Probe auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen.

2.4.3.1.3 Linearisierung der Plasmide

Es wurden von NPY und POMC jeweils eine *sense* (S)- und eine *antisense* (AS)-Probe hergestellt. Das benötigte Volumen der DNA-Lösung berechnete sich anhand der Ausgangskonzentration der isolierten Plasmid-DNA. Für die beiden NPY Proben waren jeweils 4-5 µg DNA, für die POMC Proben 10 µg DNA erforderlich. Die Proben enthielten im Einzelnen folgende Bestandteile:

Tabelle IV

	NPY-S	NPY-AS	POMC-S	POMC-AS
DEPC-H₂O	18 µl	18 µl	35,5 µl	35,5 µl
Plasmid-DNA Lösung	70 µl	70 µl	8,0 µl	8,0 µl
Puffer	10 µl (A)	10 µl (4)	5,0 µl (A)	5,0 µl (A)
Enzym	2 µl (SmaI)	2 µl (FspI)	1,5 µl (ApaI)	1,5 µl (SacI)
Gesamtvolumen	100 µl	100 µl	50,0 µl	50,0 µl

Tabelle IV: Zusammensetzung und Mengenangaben der Neuropeptid Y (NPY) und Pro-Opiomelanokortin (POMC) Proben (*antisense*: AS; *sense*: S).

Die Puffer lagerten bei –20°C und wurden vor Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut, die Enzyme (SmaI, FspI, ApaI, SacI) wurden bis zum Pipettieren bei –20°C belassen. Das DEPC-Wasser lagerte bei Raumtemperatur und die DNA-Lösung bei +4°C. Der Reihenfolge und Menge der Tabelle IV entsprechend wurden die Reagenzien nacheinander in Eppendorfcups

gefüllt. Die einzelnen Ansätze wurden durch vorsichtiges Klopfen gegen die Eppendorfcupwand gemischt und dann im Wasserbad bei 37°C ca. 6 h belassen. Die Aufbereitung wurde mit Hilfe des Qiagen Purification Kits durchgeführt. Zu je einem Volumen Plasmid wurden 5 Volumen PBS gegeben und gut gemischt. Pro Ansatz wurde eine Säule aus dem Kit auf ein Sammelgefäß gestellt, die Proben aufgetragen und 1 min zentrifugiert. Die gesammelte Flüssigkeit wurde entfernt und je 750 µl „PE-Puffer“ auf die Säulen aufgetragen und 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen jeweils auf ein frisches Eppendorfcup gestellt und die an die Säulenmembran gebundene DNA mit je 30 µl DEPC-Wasser 5 min bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend wurden die Säulen 1 min zentrifugiert, das sich im Cup gesammelte Volumen erneut aufgetragen und der Vorgang wiederholt. Je 1 µl der Lösung wurde auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen, um die Linearisierung zu überprüfen und die DNA-Konzentration zu bestimmen. Danach wurden die Eppendorfcups verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei +4°C gelagert.

2.4.3.1.4 Elektrophorese

Die Konzentration der linearisierten Plasmid-DNA (*Template*) und die Kontrolle der Linearisierung erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in einem 1%igen Agarose-Gel. In das noch flüssige Gel-Puffergemisch wurde 10%iges Ethidiumbromid gegeben und gleichmäßig untergemischt. Zu je 1 µl Probe wurde 1 µl Farbstoff zugegeben und parallel zu einem DNA-Marker auf das Gel aufgetragen. Unter UV-Licht erfolgte die Auswertung auf dem Transilluminator. Anhand der eingesetzten Markerkonzentration ließ sich die gesuchte Plasmid-DNA-Menge abschätzen. Es waren folgende DNA-Banden nach vollständiger Plasmidlinearisierung erkennbar:

NPY-*antisense*: Zwei DNA-Banden mit 1010 bp und 2194 bp (Da der Bluescribe M13(-)-Vektor, in den das 511 bp große NPY-Insert integriert ist, zwei Bindungsstellen für das Enzym FspI besitzt (bei 711 bp und 2400 bp), erscheinen in der elektrophoretischen Auftrennung des linearisierten *antisense* NPY-Plasmids zwei Banden.)

NPY-*sense*: DNA-Bande mit 3204 bp

POMC-*sense*: DNA-Bande mit 3015 bp

POMC-*antisense*: DNA-Bande mit 3015 bp

2.4.3.2 Markierung der Nukleinsäure

Nukleinsäuren lassen sich entweder nicht-radioaktiv oder radioaktiv markieren und in Form von modifizierten Nukleotiden enzymatisch in DNA oder RNA einbauen. Die radioaktive Markierung erfolgt durch den Einbau von Nukleotiden, die ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I oder ^3H enthalten. Dabei entspricht das markierte Nukleotid im Wesentlichen seinem unmarkierten Gegenstück. Die Wahl des Isotops ist von der Art der Anwendung abhängig, da die Auflösung mit steigender Sensitivität abnimmt. Das in der Arbeit verwendete Isotop ^{35}S besitzt eine mittlere Energie ($E_{\text{max}}=0,167 \text{ MeV}$) und ist ein sinnvoller Kompromiss in Bezug auf Entwicklungsdauer und Auflösung. Das Isotop wird als das kommerziell erhältliche ^{35}S -UTP in DNA oder RNA eingebaut.

Die gebräuchlichsten Markermoleküle zur Herstellung nicht-radioaktiv markierter Sonden sind Biotin und Digoxigenin (DIG), wobei im Folgenden nur auf das Letztere, in dieser Arbeit verwendete, eingegangen wird. Digoxigenin ist ein pflanzliches Steroid aus *Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata*. Es wird in Form der bereits industriell modifizierten Nukleotide Digoxigenin-11-dUTP bzw. Digoxigenin-11-UTP in DNA oder in RNA eingebaut.

2.4.3.3 Nachweis der Hybridisierungsstellen

Die Methode der Wahl zum Nachweis der radioaktiv markierten Sonden ist die Autoradiographie. Dazu bringt man die Objektträger in Kontakt mit einer strahlungsintensiven Emulsion, die auf einen Röntgenfilm aufgetragen ist. Die Schwärzung entsteht durch die Wechselwirkung von β -Strahlen, die das Isotop ausstrahlt, mit Atomen der Emulsion. Die Energie dieser Wechselwirkung reduziert Silberhalogenide in der Emulsion zu metallischem Silber und es entsteht eine unsichtbare Aufzeichnung, die man mit gängigen photographischen Methoden entwickeln und fixieren kann. Das Zentrum einer Gruppe von Silberkörnern repräsentiert die Stelle, an der die Sonde hybridisiert ist.

Nicht-radioaktiv markierte Sonden lassen sich mit Immuncytochemie nachweisen. Bei der einstufigen Variante dieser Methode bindet ein signaltragender Antikörper an das Markermolekül. In einer zweistufigen Variante der Immuncytochemie trägt ein sekundärer Antikörper, der gegen den an das Markermolekül gebundenen Primärantikörper gerichtet ist, ein Signal. Das Markermolekül Digoxigenin ist immunogen und lässt sich mit Antikörpern (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase) aufzeigen, die direkt gegen das Markermolekül gerichtet sind. Um das Signal sichtbar zu machen, benutzt man ein enzymatisches

Reportersystem, das die Präzipitation eines sichtbaren Produkts an der Hybridisierungsstelle katalysiert. Bei Nachweisreaktionen mit alkalischer Phosphatase lässt sich die höchste Sensitivität mit dem Substrat BCIP/NBT (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat/ Nitroblautetrazolium) erreichen, das zu einem blauen Präzipitat umgesetzt wird.

2.4.4 Radioaktive *in situ* Hybridisierung

Sämtliche Mengenangaben beziehen sich auf eine *in situ* Hybridisierung für 30 Objektträger und wurden nach Bedarf angepasst. Radioaktive Sicherheitsbestimmungen wurden eingehalten. Die verwendeten Chemikalien und eingesetzten Lösungen sind im Anhang aufgeführt.

2.4.4.1 *Herstellung der Sonde (in vitro Transkription)*

Unter Verwendung der entsprechenden DNA-*Templates* wurden die NPY bzw. POMC *sense*- und *antisense*-³⁵S-markierten Sonden folgendermaßen hergestellt:

2,5 µl	DEPC-Wasser
5,0 µl	5x Transkriptionspuffer
7,5 µl	DNA- <i>Template</i> (\cong 1 µg)
3,0 µl	rNTP-1:1:1 Mix (ATP, GTP, CTP)
1,0 µl	0,75 M DTT
1,0 µl	RNase Block I (= 38 I.U.)
4,0 µl	³⁵ S-UTP (= 50 µCi)
1,0 µl	RNA-Polymerase

Da das Volumen an DNA-*Template* von der Ausgangskonzentration abhing, wurde eine Abweichung von der oben genannten Angabe durch Anpassung der DEPC-Wassermenge ausgeglichen. Für die NPY und POMC *S*-Sonden wurde die T7-Polymerase, für die NPY *AS*-Sonde die T3-Polymerase und für die POMC *antisense*-Sonde die Sp6-Polymerase verwendet. Die *in vitro*-Transkription lief über einen Zeitraum von 2 h bei 37°C ab. Nach 1,5 h wurde zu jedem Ansatz 2 µl DNase gegeben, um nicht transkribierte DNA-Doppelstränge zu zerstören. Anschließend wurden die Sonden mit Hilfe einer RNA-bindenden Säule isoliert und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die unverdünnte NPY-Probe sollte 1,5-2 Mio. cpm/µl aufweisen, die POMC-Probe sollte mindestens 600.000 cpm/µl enthalten. Alle verwendeten Sonden lagen über diesen Minimumsgrenzen.

2.4.4.2 Herstellung des Hybridisierungspuffers

2500 µl	Formamid
300 µl	5M NaCl
100 µl	50x Denhardts-Lösung
50 µl	1M Tris (pH8)
40 µl	DEPC-H ₂ O
1000 µl	Dextransulfat

Um pro µl Hybridisierungslösung die erforderlichen 10.000 cpm/µl Radioaktivität zu erhalten wurde das benötigte Volumen der Sonde berechnet. Eine am Vortag der *in situ* Hybridisierung hergestellte Sonde wurde unmittelbar vor der weiteren Verwendung für 10 min auf 65°C erhitzt, um eventuell gebildete Doppelstränge zu denaturieren.

2.4.4.3 Herstellung der Hybridisierungslösung

256 µl	tRNA (3,9 mg/ml)
20 µl	1M DTT
74 µl	DEPC-H ₂ O
50 µl	³⁵ S-markierte Sonde
1600 µl	Hybridisierungspuffer

Wurden in 2 ml Lösung weniger als 50 µl markierte Sonde eingesetzt, wurde die entsprechende Differenz mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Die erneut durchgeführte Kontrollmessung der Radioaktivität sollte ca. 10.000 cpm/µl ergeben. Alle verwendeten Hybridisierungslösungen lagen bei der Kontrollmessung in dem erforderlichen Bereich.

2.4.4.4 Fixierung und Hybridisierung der Gehirnschnitte

Die Gehirnschnitte wurden aufgetaut und getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung in 4%igem Paraformaldehyd. Nach dem Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte getrocknet. Auf jeden Objektträger wurden 70 µl Hybridisierungslösung aufgetragen, das Deckgläschen mit DPX abgedichtet und die Schnitte anschließend über Nacht (ca. 18-20 h) bei 58°C hybridisiert.

2.4.4.5 Posthybridisierung

Die Objektträger wurden nach Entfernen des DPX für 30 min in 4x SSC gespült, um die Deckgläschen abzulösen. Nach viermaligem Spülen mit 4x SSC für je 5 min wurden die Schnitte einer 30-minütigen RNase-Verdauung ausgesetzt. Die RNase-Lösung enthielt 444 ml destilliertes

Wasser, 50 ml NaCl, 5 ml Tris (1M, pH 8), 1 ml EDTA (0,5M) und 1 ml RNase (0,1 mg/ml). Im Anschluss wurden mehrfach mit abnehmenden Konzentrationen an SSC (2 - 0,1xSSC) gespült und die Objektträger nach Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe getrocknet.

2.4.4.6 Filmautoradiographie

Die Hybridisierungsmuster wurden mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Die Objektträger wurden, nach verwendeten Sonden getrennt, zusammen mit je einem ^{14}C -Standard in eine Expositionskassette einsortiert und die Röntgenfilme anschließend für 6,5 Tage (NPY) bzw. 7,5 Tage (POMC) exponiert. Die Entwicklung erfolgte für 2 min in Filmentwickler (Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie, Köln, BRD) mit anschließender Fixierung (Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie, Köln, BRD) und Trocknung der Filme.

2.4.4.7 Auswertung der Röntgenfilme

Die Röntgenfilme wurden zunächst mit Hilfe eines Durchlichtscanners (PowerLookII, Umax Systems GmbH, Willich, BRD) und eines speziellen Scanprogrammes (MagicScan, Umax Systems GmbH) eingescannt. Es wurde beim Einstellen der Helligkeit und des Kontrastes darauf geachtet, dass alle 8 Felder der ^{14}C -Skala in ihrem Schwärzungsgrad zu unterscheiden waren. Die quantitative Bestimmung des Hybridisierungssignals erfolgte unter Verwendung des Programms Image ProPlus (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA). Bei jedem auszuwertenden Schnitt wurden die Fläche und die optische Dichte des Signals innerhalb der ARC Region gemessen, nachdem für alle Schnitte ein gemeinsamer Messbereich eingestellt worden war. Basierend auf der Eichkurve, die mit Hilfe der ^{14}C -Skala erstellt wurde, berechnete das Programm für jeden Schnitt einen Wert für die „integrierte optische Dichte“ (IOD), bei dem Schwärzungsgrad, Fläche und die Hintergrundkorrektur berücksichtigt wurden. Durch das Verteilen der Gehirnschnitte auf acht Serien erhält man maximal fünf auswertbare ARC-Schnitte pro Objektträger, da sich nur im medialen Abschnitt des ARC, entsprechend Bregma -2,30 bis Bregma -1,58, ein für die spätere Auswertung quantifizierbares Signal findet. In der vorliegenden Arbeit wurden in der Regel drei Schnitte pro Tier ausgewertet. Von allen ermittelten IOD-Werten eines Gehirns wurde der Mittelwert berechnet, um die relative NPY- bzw. POMC-mRNA-Konzentration im ARC jedes untersuchten Tieres zu erhalten.

2.4.5 Nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung

Sämtliche Mengenangaben beziehen sich auf eine *in situ* Hybridisierung für 12 Objektträger und wurden nach Bedarf angepasst. Die verwendeten Chemikalien und eingesetzten Lösungen sind im Anhang aufgeführt.

2.4.5.1 *RNA-Markierung*

Die Herstellung der Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde erfolgte mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, BRD):

4,0 µl	5x Puffer
2,0 µl	NTP-Labeling Mixture
2,0 µl	Polymerase
1,0 µl	RNase Inhibitor
1,0 µg	DNA

auf 20,0 µl mit DEPC-H₂O auffüllen.

Für die NPY und POMC *S*-Sonden wurde die T7-Polymerase, für die NPY *AS*-Sonde die T3-Polymerase und für die POMC *AS*-Sonde die Sp6-Polymerase verwendet. Die *in vitro*-Transkription lief bei 37°C ab. Nach 2 h wurden jedem Ansatz 2 µl DNase zugegeben und die Lösungen für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 2 µl EDTA-Lösung (0,2 mol/l, pH 8,0) gestoppt. Die Zugabe von 2,5 µl LiCl (4 mol/l) und 75 µl 100% Ethanol (-20°C) führte zum Präzipitieren der markierten RNA. Nach gutem Durchmischen der Lösung erfolgte die Fällung bei -80°C für mindestens 45 min. Anschließend wurden die Ansätze 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen ohne das RNA-Pellet zu beschädigen. Der vorhergehende Arbeitsschritt wurde mit 50 µl 70% Ethanol (-20°C) wiederholt. Die präzipitierte RNA wurde etwa 10 min luftgetrocknet, anschließend mit 30 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Ansätze wurden mit je 1 µl RNase-Inhibitor versetzt. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

2.4.5.2 *Kontrolle der Sonde*

Die Qualität und Konzentration der DIG-markierten Sonden wurden mit einem Dot-Blot-Test bestimmt. Im ersten Arbeitsschritt wurde eine Verdünnungsreihe sowohl der DIG-markierten Kontroll-RNA als auch der POMC- und NPY-DIG-Sonden hergestellt (1:20 bis 1:200.000 entsprechend 20 ng/µl bis 1 pg/µl). Je 1 µl der Verdünnungen wurde auf eine Nylonmembran aufgetragen, die Fixierung erfolgte für 30 min bei 120°C. Nach anschließendem kurzen Spülen in

Waschpuffer wurde die Membran für 40 min bei Raumtemperatur in Blocklösung inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu besetzen. Danach wurde zur spezifischen Bindung Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Lösung (1:5000 in DEPC-Wasser verdünnt) in Blockpuffer gelöst und die Membran darin für 30 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend folgte ein 2-maliges Spülen für jeweils 15 min und kurzes Schwenken in „Detectionbuffer“. Die Inkubation in der Farbstofflösung (45 µl NBT und 35 µl BCIP in 10 ml „Detectionbuffer“) erfolgte über Nacht im Kühlschrank. Die Reaktion wurde mit *Aqua dest.* gestoppt. Durch Vergleich der Farbintensität der Kontroll-RNA mit der Intensität der POMC- und NPY-RNA konnte die Konzentration der DIG-markierten Sonden geschätzt werden.

2.4.5.3 Herstellung der Hybridisierungslösung

Von einer Gesamtmenge von 4 ml ausgehend wurde folgender Ansatz gemischt:

2000 µl	Formamid
1200 µl	33% Dextransulfat
200 µl	20x SSC
80 µl	50x Denhardtslösung
40 µl	Lachssperma-DNA
400 µl	1M DTT
80 µl	DEPC-H ₂ O

Die Lösung wurde nach gründlichem Durchmischen in zwei Portionen geteilt, dementsprechend standen 2 ml Lösung für die Prähybridisierung und 2 ml für die Hybridisierung zur Verfügung. Zur letzteren wurde die DIG-markierte-Sonde in einer Konzentration von 300 ng/µl gegeben. Beide Lösungen wurden nach der Herstellung für 10 min bei 70°C erhitzt, um eventuell gebildete Doppelstränge zu denaturieren. Anschließend wurden die Ansätze bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

2.4.5.4 Fixierung und Hybridisierung der Gehirnschnitte

Die Gehirnschnitte wurden aufgetaut, getrocknet und mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Nach dem Spülen der Schnitte in 0,05M Trispuffer folgte die Proteinase K-Verdauung (2,5 µg/ml) für 20 min bei Raumtemperatur. Zur Nachfixierung wurden die Objektträger erneut in eine 4%ige Paraformaldehydlösung gegeben und anschließend in DEPC-H₂O gespült. Jeder Objektträger wurde mit 150 µl Prähybridisierungslösung benetzt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass kein Schnitt austrocknete. Die Inkubation erfolgte für 1,5 h bei 55°C. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Hybridisierungslösung

auf gleiche Weise aufgetragen. Die Schnitte wurden bei 55°C über Nacht (18 - 22 h) in einer feuchten Schale hybridisiert.

2.4.5.5 *Posthybridisierung*

Die Objektträger wurden nach Entfernen der Deckgläschen für 30 min in 2x SSC bei Raumtemperatur gespült und anschließend mit abnehmenden Konzentrationen an SSC (2 - 0,2x SSC) bei Hybridisierungstemperatur gespült. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Umpuffern in 1x PBS folgte das Blocken in 5%igem Rinder-Serum-Albumin für 30 min. Die anschließende Inkubation mit Anti-DIG-Alkalische Phosphatase (1:600) dauerte 1,5 h. Nach Spülen in 1x PBS und Umpuffern wurden je 150 µl der Farbstofflösung auf die Objektträger aufgetragen. Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer über Nacht in den Kühlschrank gestellt, die Reaktion wurde am nächsten Tag durch *Aqua dest.* abgestoppt.

2.4.5.6 *Auswertung der Schnitte*

Die Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 35, Carl Zeiss Unternehmensbereich Mikroskopie, Göttingen, BRD) beurteilt. Ein genaues Auszählen der markierten Neurone im ARC war durch die dichte Anordnung der Zellen in diesem Kerngebiet nicht möglich. Die NPY-exprimierenden, markierten Neurone im VMN und DMN liegen jedoch einzeln und isoliert, so dass sich ihre Zahl durch den Beobachter ermitteln ließ. In jedem auswertbaren Gehirnschnitt (in der Regel 3-4 Schnitte) wurden zuerst die Nervenzellen in den beiden Kerngebieten getrennt voneinander gezählt, dabei wurde ein Mittelwert aus den beiden lateralen Hälften der Kerne und den bewerteten Schnitten gebildet. Da sich innerhalb der beiden Kerngebiete kein Unterschied bezüglich der Anzahl der markierten Neurone ergab, wurde die Summe aus den in VMN und DMN gezählten Nervenzellen gebildet. Die isoliert liegenden NPY-mRNA markierten Neurone im Cortex wurden auf einer Fläche von 600 x 600 µm als Kontrolle unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

2.4.6 Histologische Färbemethoden

2.4.6.1 *Nisslfärbung mit Kresylviolett*

Neurone enthalten als charakteristisches morphologisches Merkmal so genannte Nisslschollen (Stapel des rauhen endoplasmatischen Retikulums). Diese Schollen lassen sich mit Kresylviolett anfärben, so dass man Nervenzellen mit dieser Technik selektiv anfärben kann. Zur Färbung

wurde eine 0,5%ige Kresylviolett-Lösung verwendet, die sich aus 30 ml 0,1M Natriumacetat (Merck KgaA, Darmstadt, BRD), 170 ml 0,1M Essigsäure (Merck KgaA, Darmstadt, BRD) und 300 ml *Aqua dest.* zusammensetzte und vor Gebrauch filtriert wurde. Nach Fixation in 4%igem Paraformaldehyd (Herstellung siehe Anhang) wurden die Schnitte kurz in *Aqua dest.* geschwenkt und anschließend für mindestens 10 min in der Färbelösung behandelt. Nach kurzem Eintauchen in 70%igem Ethanol und Spülen in 96%igem Ethanol wurden die Schnitte kurz in Xylol (Merck KgaA, Darmstadt, BRD) geklärt. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit Entellan (Merck KgaA, Darmstadt, BRD) und Deckgläschen eingedeckt.

2.4.6.2 Kernechtrotfärbung

Dieser Farbstoff gehört zu der Gruppe der Anthrachinone und färbt die Kerne aller Zellen leuchtend rot an. Das Cytoplasma wird hell rosa angefärbt. Zur Herstellung der Färbelösung wurde in 100 ml einer kochenden 5%igen Aluminiumsulfatlösung 0,1 g Kernechtrot (Merck KgaA, Darmstadt, BRD) aufgelöst. Die Lösung wurde nach dem Erkalten filtriert. Die Schnitte wurden für 10 min in der Lösung gefärbt, anschließend in *Aqua dest.* gespült, vollständig in aufsteigender Ethanolreihe (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD) entwässert und mit Entellan (Merck KgaA, Darmstadt, BRD) und Deckgläschen eingedeckt.

2.5 Statistische Datenauswertung

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zur Expression von NPY, POMC, AGRP und CART¹⁵ wurden mittels verschiedener statistischer Verfahren ausgewertet, die an die jeweilige Fragestellung bzw. Art der Darstellung angepasst waren. Zur besseren Übersicht über die verwendeten statistischen Methoden, die im Folgenden näher beschrieben werden, wird in Klammern auf die entsprechenden Abbildungen im nachfolgenden Ergebnisteil hingewiesen.

2.5.1 Allgemeine Angaben

Für die statistischen Tests wurden, abhängig von dem statistischen Verfahren, verschiedene Computerprogramme verwendet. Die Signifikanzniveaus wurden mit * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ und *** = $P < 0.001$ gekennzeichnet. Ergaben die statistischen Untersuchungen keine Signifikanz ($P > 0.05$), wurden die Ergebnisse mit "ns" ("nicht signifikant") gekennzeichnet. Von einer Tendenz wurde bei einem $P < 0.1$ gesprochen.

¹⁵ Ergebnisse AGRP und CART: Diplomarbeit C. Pauli, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

2.5.2 Regressionsanalysen

2.5.2.1 *Lineare Korrelationen*

Zur Ermittlung von Korrelationskoeffizienten wurden gängige Standardverfahren zur Bestimmung von Regressionsgeraden nach der Methode der kleinsten Quadrate hinzugezogen.

$$y = Y_0 + a \cdot x$$

Die Parameter (Konstanten) der Gleichung stellen dar:

Y_0 : absolutes Glied, Schnittpunkt der Y-Achse

a : Regressionskoeffizient

Die Signifikanz der Unterschiede der Korrelationskoeffizienten (r) gegen Null wurde geprüft (Sachs, 1997) (Abb. 2-5; 7-8; 10A, C, 11-12; 14, 17 und 22). Sind Konfidenzintervalle dargestellt, so begrenzen diese den Bereich, in dem ein beliebiger Datenpunkt mit 95%iger Wahrscheinlichkeit lokalisiert ist (Abb. 15).

Bei dem Vergleich zweier Regressionsgeraden wurden diese durch Anwendung des hauseigenen Statistikprogramms (MPIStat) zunächst auf Parallelität (Gleichheit der Regressionskoeffizienten), anschließend -bei statistisch nicht auszuschließender Parallelität- auf Unterschiede im y-Achsenabschnitt untersucht (Brownlee, 1965). Die Regressionsgeraden der Neuropeptid-expression innerhalb der verschiedenen *in situ* Hybridisierungen (I1-I4) wurden vor dem "Poolen" (siehe 2.5.3) auf Parallelität untersucht (Abb. 2-5). Bei der Untersuchung physiologischer Parameter der 9 Monate alten Tiere wurden die Geraden für die beiden Geschlechter miteinander verglichen (Abb. 8, 11, 12, 14), die Regressionsgeraden für den Zusammenhang zwischen der Zahl der NPY Neurone im VMN und DMN und dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel wurden hinsichtlich eines Genotypunterschiedes untersucht (Abb. 22).

2.5.2.2 *Nicht-lineare Korrelationen*

Für die statistische Beschreibung der offensichtlich nicht-linearen Beziehung zwischen der Plasmaleptinkonzentration bzw. Plasmainsulinkonzentration und Körperfett bei den Weibchen ergab sich als beste Anpassung eine 3-parametrische Wachstumskurve in der Form:

$$y = Y_0 + a * e^{(b*x)}$$

Die 3 Parameter (Konstanten) der Gleichung stellen dar:

Y_0 : absolutes Glied,

a: Proportionalitätskonstante der e -Funktion,

b: Proportionalitätskonstante der unabhängigen Variablen im Exponenten von e .

Mit y als abhängiger Variable (Plasmaleptinkonzentration in ng/ml) und x als unabhängiger Variable (Körperfettgehalt) erfolgte die Anpassung der nicht-linearen Regression entsprechend dieser Formel mit dem Programm SigmaPlot 2001 (SPSS Inc., Chigaco, USA). Das Programm erlaubt es, die biologisch plausible Annahme: $y \approx 0$, wenn $x = 0$, in die Berechnung einzuführen (Abb. 10B, D).

2.5.3 z-Transformation

Die Neuropeptidexpressionen wurden in verschiedenen experimentellen Sets gemessen. Dabei wurde von jedem Set jeweils die NPY, POMC, AGRP und CART Expression in parallelen Gehirnschnitten bestimmt. Nach der densitometrischen Messung der verschiedenen Peptide wurden die für die verschiedenen Peptide ermittelten Werte eines jeden experimentellen Sets gegen Körperfettprozent bzw. Plasmaleptinkonzentration aufgetragen. Die Regressionsgeraden der verschiedenen *in situ* Hybridisierungen für ein Neuropeptid sind in ihrer Korrelation zu den systemischen Parametern parallel verschoben und unterscheiden sich deutlich im Y-Achsenabschnitt. Diese Unterschiede im Y-Achsenabschnitt sind methodisch bedingt. Inkubationszeit und Dauer der Entwicklung des Films spielen ebenso eine Rolle wie Sondenkonzentration, Hybridisierungsdauer oder Bildbearbeitung. Um eine gemeinsame Regression aller experimentellen Sets zwischen jedem untersuchten Neuropeptid und den systemischen Parametern möglich zu machen, wurden die Expressionswerte standardisiert und anschließend gepoolt. Die Standardisierung erfolgte durch z-Transformation.

Die nötige Voraussetzung um Daten „poolen“ zu können, ist eine Parallelität der Regressionsgeraden. Ist diese Voraussetzung erfüllt, werden die Daten der einzelnen *in situ* Hybridisierungen standardisiert. Diese standardisierende z-Transformation wurde mit dem Computerprogramm SigmaStat (SPSS Corporation, Chigaco, USA) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird der Mittelwert eines Datensatzes gebildet, von der Summe aller Werte in diesem

Datensatz subtrahiert und der gebildete Wert anschließend durch die Standardabweichung dividiert. Standardisierte Daten haben laut Definition einen Mittelwert von Null und eine Standardabweichung von Eins. Die standardisierten Daten der verschiedenen *in situ* Hybridisierungen können anschließend in einen Plot eingetragen werden und wie ein gemeinsamer Datensatz behandelt werden. Je nach Fragestellung wurde der Datensatz der jüngeren Tiere (35 und 56 Tage alt, Altersgruppe 1) und der älteren Tiere (9 Monate alt, Altersgruppe 2) getrennt oder aber gemeinsam transformiert (Abb. 2-5C, D; 15).

2.5.4 Varianzanalysen

Die Varianzanalysen wurden je nach Fragestellung entweder an den Rohdaten oder aber an den transformierten Daten durchgeführt. Bei der Durchführung von Varianzanalysen (ANOVA) mit dem Computerprogramm SigmaStat (SPSS Corporation, Chigaco, USA) wurden die vorliegenden Daten zunächst auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov und gleiche Varianzen (Levene-Median-Test) geprüft. War eine Bedingung nicht erfüllt, wurde die Rangordnung der Werte bestimmt und die Varianzanalyse mit diesen Rangwerten ausgeführt (Bortz, 1989). Als post-hoc Test wurde der Bonferroni-Test verwendet. Das Maß der Streuung ist als der mittlere Fehler des gewichteten Mittelwertes (\pm SEM) angegeben (Abb. 9, 13; Tab. VI, VII).

Die Kovarianzanalysen (ANCOVA) wurden mit dem Programm Statistica (StatSoft GmbH, Hamburg, BRD) durchgeführt. Die ANCOVA auf Basis des allgemeinen linearen Modells vereint die qualitative und quantitative Analyse der Einflussgrößen. Dabei wird eine quantitative Kovariable aus den qualitativen Faktoren herauspartialisiert¹⁶. In der vorliegenden Arbeit wurde der quantitative Einfluss des Körperfettgehaltes bzw. des Plasmaleptinspiegels auf die Neuropeptidexpression aus den qualitativen Faktoren wie Genotyp oder Alter herauspartialisiert. Um den Einfluss des Genotyps auf die Expression der untersuchten Neuropeptide zu prüfen, wurden die Daten der beiden Altersgruppen zunächst getrennt standardisiert und anschließend in separaten ANCOVAs mit Genotyp als Faktor und einer Kovariablen (z.B. Körperfettgehalt) ausgewertet (Tab. V). Um Altersunterschiede zwischen den beiden Gruppen zu untersuchen, wurden die Daten der Tiere jedoch gemeinsam standardisiert und in einer gemeinsamen ANCOVA mit Genotyp und Alter als Faktoren sowie einer Kovariablen analysiert (Tab. IX). Für die Darstellung der Ergebnisse wurde die Summe der kleinsten Quadrate bestimmt und mit ihrer Standardabweichung (\pm SEM) dargestellt, als *post-hoc* Test wurden die Kontraste dieser Summe

¹⁶ Der statistische Begriff "herauspartialisieren" beschreibt den Vorgang, die abhängige Variable von dem Einfluss einer Kovariablen zu "bereinigen" (Bortz, 1989).

bestimmt und nach Bonferroni mit der Anzahl der untersuchten Kontraste (z.B. Anzahl der Genotypen, die miteinander verglichen wurden) multipliziert (Abb. 6 und 16).

Zur Auswertung der physiologischen Daten der 9 Monate alten Tiere wurden ebenfalls ANCOVAs berechnet. Bei der Analyse der Leptin- und Insulinwerte der untersuchten Mäuse wurde zunächst der Einfluss des Geschlechts und des Genotyps auf die Blutwerte aller untersuchten Tiere nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes bestimmt (Geschlecht und Genotyp als Faktoren, Körperfettgehalt als Kovariable). Anschließend wurde der Genotypeinfluss auf die Plasmaleptin- bzw. Insulinspiegel unter Berücksichtigung des Körperfettgehaltes bei den Weibchen und Männchen in getrennten ANCOVAs untersucht (Genotyp als Faktor und Körperfettgehalt als Kovariable). Die Summe der kleinsten Quadrate wurde bestimmt und die *post-hoc* Tests wurden wie oben beschrieben durchgeführt (Tab. VIII; Abb. 13B).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Neuropeptidexpression im Nukleus arcuatus bei 35 und 56 Tage alten Tieren

3.1.1 Einfluss systemischer Parameter auf die Neuropeptidexpression - Vergleich der parallelen und „gepoolten“ Darstellungen

Die Expression der Neuropeptide im Nukleus arcuatus (ARC) wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen gemessen¹⁷. In jedem Ansatz wurde jeweils die Expression von Neuropeptid Y (NPY), Pro-Opiomelanokortin (POMC), *Agouti*-related protein (AGRP) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated transcript (CART) in parallelen Gehirnschnitten von Wildtypen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) MC4R-defizienten Mäusen bestimmt (Abb. 1). Um eine gemeinsame Regression aller experimentellen Sets zwischen jedem untersuchten Neuropeptid und den systemischen Parametern zu ermöglichen, wurden die Expressionswerte standardisiert und anschließend „gepoolt“ (siehe 2.5.3; Weide *et al.*, 2003).

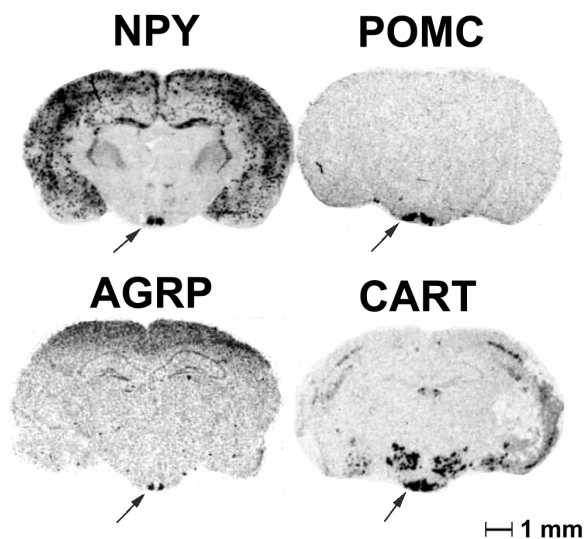


Abb. 1: Neuropeptid Y (NPY), Pro-Opiomelanokortin (POMC), *Agouti*-related protein (AGRP) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART) Expression in 20 μ m Frontalschnitten der Gehirne von MC4R-defizienten Mäusen am Beispiel repräsentativer Einzelschnitte von 56 Tage alten homozygoten Tieren. Gezeigt ist das nach Durchführung einer radioaktiven *in situ* Hybridisierung auf dem Röntgenfilm sichtbare Hybridisierungsmuster. Für die spätere quantitative Auswertung wurde nur die integrierte optische Dichte des markanten Hybridisierungssignals im Nukleus arcuatus (Pfeile) quantitativ bestimmt.

¹⁷ Die *in situ* Hybridisierungen wurden in Zusammenarbeit mit K. Moar, S. Eiden und C. Pauli am Rowett Research Institute in Aberdeen, Schottland, durchgeführt.

Die NPY Expression von 35 und 56 Tage alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen ist signifikant negativ mit dem Körperfettgehalt¹⁸ und dem Plasmaleptinspiegel korreliert (Abb. 2). In Abb. 2A, B sind die Messwerte der integrierten optischen Dichten (IOD) von I1 (mittlerer Plot), I2 (unterer Plot) und I3 (oberer Plot) aufgetragen ($r = -0.42$ bis -0.78 ; $P < 0.05$ bis $P < 0.001$). Der Einfluss des Körperfettgehaltes auf die NPY Expression überwiegt gegenüber dem des Genotyps oder des Alters der Tiere. Aus diesem Grund lassen sich die Expressionswerte der 35 Tage alten +/+, +/- und -/- Mäuse zusammen mit den 56 Tage alten Tieren auf einer gemeinsamen Regressionsgeraden darstellen. Bei I3 wurden zusätzlich Expressionswerte von 21 Tage alten Tieren (Symbol Raute) bestimmt. Die Daten dieser jüngeren Tiere liegen bei allen drei Genotypen über der gemeinsamen Gerade der älteren Tiere und wurden nicht in die Regression einbezogen. Durch das gemeinsame Standardisieren und "Poolen" der NPY Daten der 35 und 56 Tage alten Tiere konnte eine gemeinsame Regression der drei experimentellen Sets mit Körperfettgehalt ($r = -0.57$) und Plasmaleptinspiegel ($r = -0.46$) erstellt werden (C, D). Auch in der "gepoolten" Abbildung ist zu erkennen, dass die Werte der Tiere in diesem Alter unabhängig vom Genotyp auf einer gemeinsamen Geraden liegen.

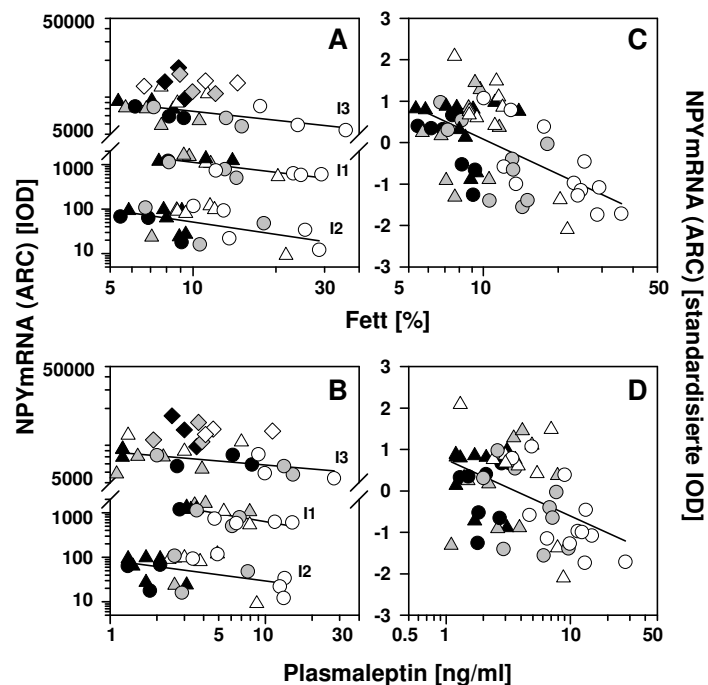


Abb. 2: Neuropeptid Y (NPY) Expression im Nukleus arcuatus (ARC) von Wildtypen (+/+, schwarz) und heterozygoten (+/-, grau) bzw. homozygoten (-/-, weiß) MC4R-defizienten Mäusen, die 35 Tage (Dreieck) und 56 Tage (Kreis) alt waren. Dargestellt sind die

¹⁸ In der vorliegenden Arbeit wird der Körperfettgehalt in Prozent, die Körperfettmasse in Gramm angegeben. Die Neuropeptidexpression wird im Zusammenhang mit dem Körperfettgehalt betrachtet, da sich dieser Parameter für Vergleiche unterschiedlicher Altersgruppen besser eignet als die Körperfettmasse (Hufnagel, 2001).

(Fortsetzung Abb. 2): Ergebnisse der integrierten optischen Dichte (IOD)-Messung. Die dargestellten Einheiten dienen nur dem relativen Vergleich. Aus Gründen der Übersicht wurden die Messwerte von I1 mit dem Faktor 10000 und die Werte von I2 mit dem Faktor 1000 multipliziert. Bei I3 sind zusätzlich die Daten 21 Tage alter Tiere dargestellt (Raute, nicht in die Regression einbezogen). **A, B:** Parallele Abbildung der verschiedenen *in situ* Hybridisierungen in doppelt-logarithmischer Darstellung. Individuelle Werte für die Korrelation zum Körperfettgehalt (A): $-0.5 < r < -0.78$ bzw. zum Plasmaleptinspiegel (B): $-0.42 < r < -0.74$. **C, D:** Individuelle Werte derselben Tiere nach Standardisieren und "Poolen" der logarithmisierten Neuropeptidwerte in halb-logarithmischer Darstellung. $r = -0.57$ (C); $r = -0.46$ (D).

Zwischen der POMC Expression im ARC und dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel der Tiere besteht, im Gegensatz zu der negativen Korrelation mit NPY, eine positive Korrelation (Abb. 3). In der parallelen Darstellung (A, B) der verschiedenen *in situ* Hybridisierungen I1 (mittlerer Plot), I2 (unterer Plot) und I3 (oberer Plot) korrelieren die Werte von I2 und I3 ($r = 0.47$ bis 0.72 , $P < 0.05$ bis $P < 0.001$) signifikant mit den systemischen Parametern, die Werte von I1 ($r = 0.06$) sind jedoch nicht signifikant korreliert. Die Expressionswerte der 21 Tage alten Tiere (I3, Symbol Raute) liegen bei POMC auf der Geraden der älteren Tiere, die unabhängig von Genotyp und Alter eine gemeinsame Regressionsgerade bilden. Werden die standardisierten Expressionswerte gepoolt (Abb. 3 C, D) ergibt sich die gleiche signifikante Korrelation ($P < 0.001$) mit Körperfettgehalt und Plasmaleptinspiegel.

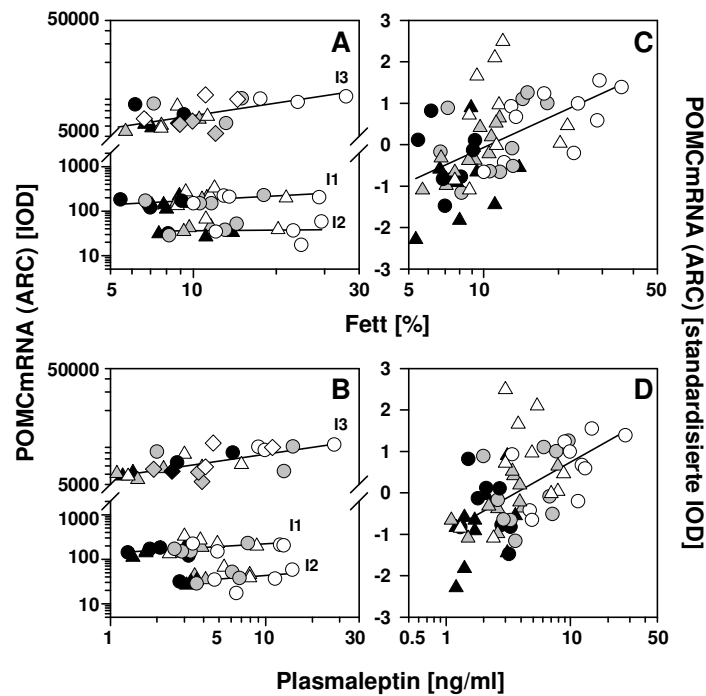


Abb. 3 (vorhergehende Seite): *Pro-Opiomelanokortin (POMC) Expression im Nukleus arcuatus (ARC) von Wildtypen (+/+, schwarz) und heterozygoten (+/-, grau) bzw. homozygoten (-/-, weiß) MC4R-defizienten Mäusen, die 35 Tage (Dreieck) und 56 Tage (Kreis) alt waren. Dargestellt sind die Ergebnisse der integrierten optischen Dichte (IOD)-Messung. Die dargestellten Einheiten dienen nur dem relativen Vergleich. Aus Gründen der Übersicht wurden die Messwerte von I1 mit dem Faktor 1000 multipliziert. Bei I3 sind zusätzlich die Daten 21 Tage alter Tiere dargestellt (Raute, nicht in die Regression mit einbezogen). A, B: Parallele Abbildung der verschiedenen in situ Hybridisierungen in doppelt-logarithmischer Darstellung. Individuelle Werte für die Korrelation zum Körperfettgehalt (A): $0.06 < r < 0.67$ bzw. zum Plasmaleptinspiegel (B): $0.40 < r < 0.72$. C, D: Individuelle Werte derselben Tiere nach Standardisieren und Poolen der logarithmisierten Neuropeptidwerte in halb-logarithmischer Darstellung. $r = -0.52$ (C); $r = -0.55$ (D).*

Die Expression des orexigenen AGRP bildet eine negative Korrelation mit den systemischen Parametern, vergleichbar mit dem koexprimierten NPY in denselben Neuronen des ARC (Abb. 4). Die Regressionskoeffizienten liegen bei der parallelen Darstellung (A, B) bei $r = -0.51$ bis -0.76 , $P < 0.01$ bis $P < 0.001$, wobei der mittlere Graph I1, der untere Graph I2 und die obere Gerade I3 darstellt. In der "gepoolten" Darstellung der experimentellen Sets (C, D) sind die untersuchten Parameter eng miteinander korreliert ($r = -0.57$, $P < 0.001$ für AGRP versus Körperfettgehalt; $r = -0.29$, $P < 0.005$ für AGRP versus Plasmaleptin).

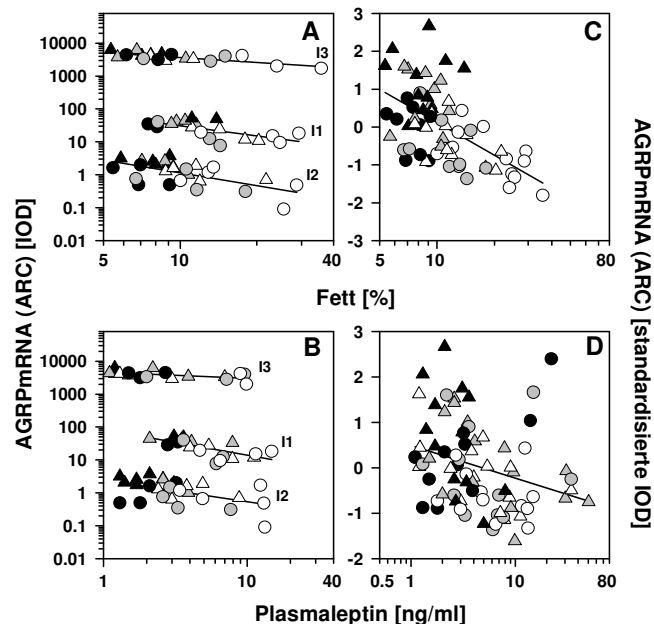


Abb. 4: *AGRP Expression im Nukleus arcuatus (ARC) von Wildtypen (+/+, schwarz) und heterozygoten (+/-, grau) bzw. homozygoten (-/-, weiß) MC4R-defizienten Mäusen, die 35 (Dreieck) und 56 Tage (Kreis) alt waren. Dargestellt sind die Ergebnisse der integrierten optischen Dichte (IOD)-Messung. Die dargestellte Einheit dient nur dem relativen*

(Fortsetzung Abb. 4) Vergleich. Aus Gründen der Übersicht wurden die Messwerte von I3 mit dem Faktor 100 multipliziert und die Werte von I2 durch 10 dividiert. **A, B:** Parallele Abbildung der verschiedenen in situ Hybridisierungen in doppelt-logarithmischer Darstellung. Individuelle Werte für die Korrelation zum Körperfettgehalt (A): $-0.63 < r < -0.76$ bzw. zum Plasmaleptinspiegel (B): $-0.51 < r < -0.68$. **C, D:** Individuelle Werte derselben Tiere nach Standardisieren und Poolen der logarithmisierten Neuropeptidwerte in halb-logarithmischer Darstellung. $r = -0.57$ (C); $r = -0.29$ (D).

Für die Expression des anorexigenen CART (Abb. 5), das zusammen mit POMC exprimiert wird, ergibt sich der Eindruck einer positiven Beziehung mit dem Körperfettgehalt und dem Plasmaleptinspiegel. Die Regressionskoeffizienten ($r = 0.3$ bis < 0.1) sind jedoch weder in der parallelen Abbildung (A, B), noch in der "gepoolten" Darstellung (C, D) signifikant. Allerdings lässt sich in einigen Fällen die Tendenz zu einer Korrelation ($P < 0.1$) erkennen.

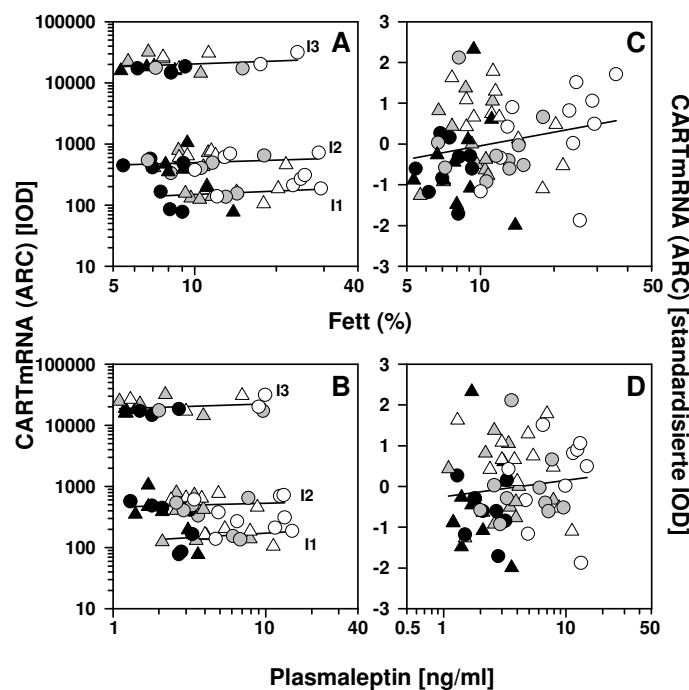


Abb. 5: CART Expression im Nukleus arcuatus (ARC) von Wildtypen $+/+$ (schwarz) und heterozygoten $+/-$ (grau) bzw. homozygoten $-/-$ (weiß) MC4R-defizienten Mäusen, die 35 (Dreieck) und 56 Tage (Kreis) alt waren. Dargestellt sind die Ergebnisse der integrierten optischen Dichte (IOD)-Messung. Die dargestellte Einheit dient nur dem relativen Vergleich. Aus Gründen der Übersicht wurden die Messwerte von I3 mit dem Faktor 100 multipliziert. **A, B:** Parallele Abbildung der verschiedenen in situ Hybridisierungen in doppelt-logarithmischer Darstellung. Individuelle Werte für die Korrelation zum Körperfettgehalt (A): $0.1 < r < 0.3$ bzw. zum Plasmaleptinspiegel (B): $0.1 < r < 0.26$. **C, D:** Individuelle Werte derselben Tiere nach Standardisieren und Poolen der logarithmisierten Neuropeptidwerte in halb-logarithmischer Darstellung. $r = 0.22$ (C); $r = 0.13$ (D).

Schlussfolgerung:

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression der untersuchten Neuropeptide im ARC bei 35 und 56 Tage alten Tieren vom Körperfettgehalt und Plasmaleptinspiegel bestimmt wird. Mögliche Einflüsse von Genotyp und Alter sind nicht offensichtlich. Die NPY und AGRP Expression sinkt, die POMC und CART Expression steigt hingegen mit zunehmendem Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinspiegel an, die orexigenen Peptide werden also entgegengesetzt zu den anorexigenen Peptiden beeinflusst. Junge Tiere scheinen dementsprechend unabhängig vom Genotyp in der Lage zu sein, Signale über ihren Körperfettgehalt zu empfangen und die Neuropeptidexpression im Sinne einer zentralen Gegenregulation in Reaktion auf die Größe der Fettdepots zu verändern.

3.1.2 Einfluss des Genotyps auf die Neuropeptidexpression

Die Abbildungen 2 bis 5 stellen den Zusammenhang zwischen dem Körperfettgehalt und der Neuropeptidexpression aller untersuchten 35 und 56 Tage alten Tiere gemeinsam dar. Um jedoch einen potentiellen, auf den ersten Blick nicht erkennbaren, zusätzlichen Effekt des Genotyps auf die Expression der Neuropeptide bei diesen jungen Tieren zu untersuchen, wurde der Einfluss des Körperfettgehaltes mithilfe einer Kovarianzanalyse (ANCOVA) mit den logarithmisierten Körperfettgehaltswerten als Kovariable und dem Genotyp als Faktor herauspartialisiert (Abb. 6, folgende Seite). Die Ergebnisse zeigen, dass der Genotyp einen signifikanten Einfluss auf die Expression von NPY (A), POMC (B) und AGRP (C) (alle $P < 0.001$), bzw. CART (D) ($P < 0.05$) im ARC hat (Abb. 6 und Tab. V). Die ANCOVA ergab für POMC und CART einen Anstieg der Expression mit zunehmender Anzahl der defekten Allele. Nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes lässt sich zeigen, dass homozygote Tiere signifikant mehr POMC und CART exprimieren als Wildtypen, zwischen $+/+$ und $+/-$ bzw. zwischen $+/-$ und $-/-$ Tieren ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Die NPY Expression war in Wildtypen und $+/-$ Tieren ähnlich stark, in $-/-$ Mäusen aber signifikant erhöht ($+/+ = +/- < -/-$). Die genotypabhängige Zunahme der Expression bei POMC und CART verläuft dem visuellen Eindruck nach steiler als bei NPY. Interessanterweise zeigt sich bei der AGRP Expression ein signifikanter gegenteiliger Gesamteffekt des Genotyps (Tab. V). Nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes wird erkennbar, dass die Wildtypen mehr AGRP exprimieren als die heterozygoten und die homozygoten MC4R-defizienten Mäuse (Abb. 6C), jedoch unterscheidet sich die AGRP Expression im *post-hoc* Test bei keinem der drei Genotypen

signifikant voneinander. Die AGRP Expression bei +/+ zeigt allerdings im Verhältnis zu den -/- Mäusen eine tendenzielle Abnahme ($P < 0.1$).

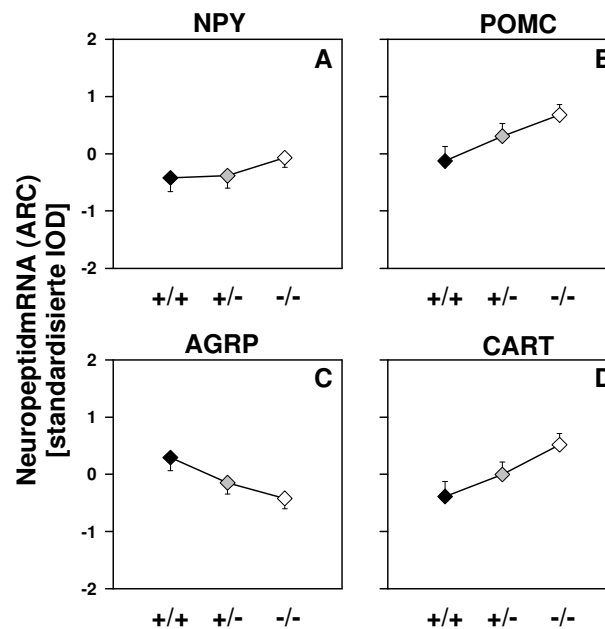


Abb. 6: Expressionsdaten der untersuchten Neuropeptide im Nukleus arcuatus (ARC) aus den verschiedenen *in situ* Hybridisierungen von 35 und 56 Tage alten Wildtypen (+/+, schwarz), heterozygoten (+/-, grau) und homozygoten (-/-, weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Kovarianzanalyse (ANCOVA) für die standardisierte integrierte optische Dichte (IOD)-Messungen mit Genotyp als Faktor und Körperfettgehalt als Kovariable. Die dargestellte Einheit dient nur dem relativen Vergleich. Neuropeptid Y (NPY, A), Pro-Opiomelanokortin (POMC, B), Agouti-related protein (AGRP, C), Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART, D). Die Ergebnisse sind als kleinste mittlere Quadrate mit ihrer Standardabweichung dargestellt. Die Gesamteffekte der ANCOVA sind in Tabelle V gezeigt.

Setzt man anstelle des Körperfettgehaltes den logarithmisierten Plasmaleptinspiegel als Kovariable in der ANCOVA ein, so werden sehr ähnliche Gesamteffekte des Genotyps auf die Neuropeptidexpression im ARC sichtbar (Tab. V).

	Körperfett- gehalt	Plasmaleptin- spiegel
	Gesamteffekt des Genotyps	
NPY	***	***
POMC	**	*
AGRP	***	***
CART	*	*

Tabelle V: Ergebnisse der Kovarianzanalyse (ANCOVA) mit Genotyp als Faktor und Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinkonzentration als Kovariable. Dargestellt ist der Gesamteffekt des Genotyps auf die Neuropeptidexpression von 35 und 56 Tage alten Tieren. Neuropeptid Y: NPY; Pro-Opiomelanokortin: POMC; Agouti-related protein: AGRP; Cocaine-and-Amphetamine-regulated transcript: CART. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

In der vorliegenden Arbeit wurde kein Hinweis auf einen geschlechtsbedingten Unterschied der Neuropeptidexpression gefunden. Da sich jedoch die Zusammenstellung der Versuchsgruppen für einen aussagekräftigen Vergleich nicht gut eignet (nur in I4 wurden Weibchen und Männchen zusammen betrachtet), sollte der fehlende Geschlechtseinfluss auf die Neuropeptidexpression mit Vorbehalt betrachtet werden. Die Frage nach einem Geschlechtsunterschied müssen weitere Versuche klären, in denen eine größere Anzahl von männlichen und weiblichen Tieren in einer *in situ* Hybridisierung gemeinsam untersucht werden.

Schlussfolgerung:

Mittels ANCOVA lässt sich, nach Herausparsialisieren des Körperfettgehaltes bzw. der Plasmaleptinkonzentration, ein signifikanter Einfluss des Genotyps auf die Expression aller vier untersuchten Neuropeptide nachweisen, obwohl die visuelle Kontrolle der Beziehung zwischen diesen Parametern (Abb. 2-5) scheinbar keinen Einfluss des Genotyps auf die Neuropeptidexpression zeigte. Die Darstellung der Richtung des Genotypeffekts (Abb. 6) muss als eine mathematische Ableitung der Beziehung zum Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinkonzentration (Abb. 2-5) verstanden werden. Dabei wird die Veränderung der NPY Expression mit steigendem Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinspiegel abgeschwächt, während die Veränderungen der POMC, CART und AGRP Expression durch den Einfluss des Genotyps verstärkt werden. Betrachtet man die Regulation der untersuchten Neuropeptide, so folgt die Richtung des Genotypeffekts bei POMC, CART und AGRP einer anorexigenen Antwort mit steigendem Gendefekt. Der Genotypeinfluss auf die NPY Expression, die bei den -/- Tieren trotz einer negativen Korrelation zum Körperfettgehalt erhöht ist, beschreibt hingegen eine orexigene Antwort. Regulatorische Kompensationsmechanismen gegen eine Zunahme der Fettdepots scheinen im Hinblick auf die, eine orexigene Reaktion vermittelnde NPY Expression bei -/- Tieren bereits in dieser Altersstufe nachzulassen.

3.2 Untersuchung physiologischer Parameter bei 9 Monate alten Tieren

3.2.1 Körperfettgehalt und Wassergehalt

Bei Tieren einer Altersgruppe ist die Korrelation zwischen dem Körperfettgehalt und dem Wassergehalt so eng korreliert ($r = -0.99$), dass sie zur methodischen Kontrolle der bei der Bestimmung der Körperzusammensetzung erhaltenen Werte dienen kann. Um methodische Fehler bei der Untersuchung der 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäuse

(N = 105; siehe Tab. III) auszuschließen, wurde zu Beginn der Auswertung die Korrelation zwischen dem Anteil an Körperwasser und dem Körperfettgehalt der Tiere betrachtet (nicht abgebildet). Tiere, deren Werte aufgrund von Messfehlern ober- oder unterhalb der Regressionsgeraden liegen, können leicht identifiziert und aus der weiteren Auswertung herausgenommen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden von allen untersuchten 9 Monate alten Tieren ein Weibchen und zwei Männchen nicht in die weitere Auswertung der systemischen Parameter und der *in situ* Hybridisierung einbezogen, da die Werte dieser Tiere so weit von der Regressionsgeraden zwischen Körperwasser und Körperfettgehalt entfernt lagen, dass methodische Fehler nicht ausgeschlossen werden konnten.

3.2.2 Feuchtmasse und Fettfreie Trockenmasse (FFDM)

Innerhalb geschlossener Altersgruppen besteht eine weitere sehr enge Beziehung zwischen Feuchtmasse und FFDM (Hufnagel, 2001), die in der vorliegenden Arbeit sowohl bei den Männchen ($r = 0.91$) als auch bei den Weibchen ($r = 0.89$) zu erkennen ist (Abb. 7). Die hier erhobenen Daten zeigen darüber hinaus, dass die FFDM mit zunehmender Feuchtmasse bei den Männchen steiler ansteigt als bei den Weibchen, dementsprechend weisen die männlichen Tiere bei allen drei Genotypen einen höheren Anteil an FFDM bei gleicher Feuchtmasse auf als die weiblichen Mäuse gleichen Genotyps.

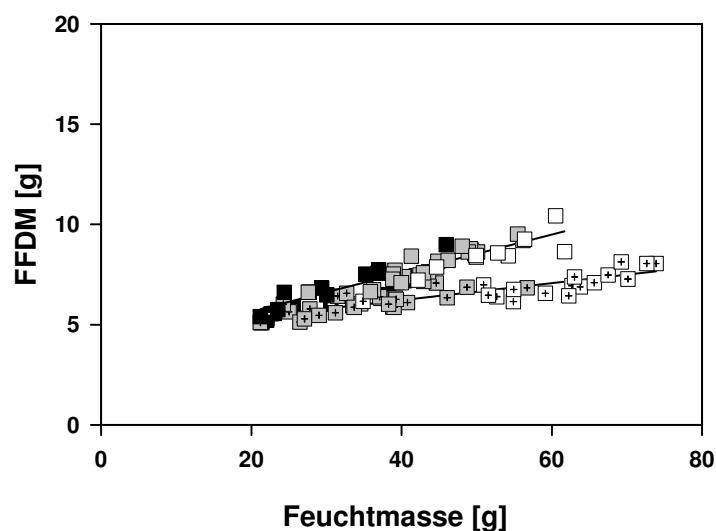


Abb. 7: Korrelation zwischen der Fettfreien Trockenmasse (FFDM) und der Feuchtmasse von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (schwarz) 9 Monate alten MC4R-defizienten Mäusen. Die Regressionen für die Weibchen (Quadrate mit Kreuz; $r = 0.89$) und die Männchen (Quadrate; $r = 0.91$) wurden getrennt berechnet.

3.2.3 Feuchtmasse und Körperfett

Der Zusammenhang zwischen der Feuchtmasse und der Körperfettmasse ist ebenfalls eng und muss, wie die Beziehung zwischen Feuchtmasse und FFDM, für Männchen und Weibchen getrennt betrachtet werden (Abb. 8A). Aufgrund der großen Spannweite der Werte ergibt sich bei den untersuchten Tieren eine besonders enge Korrelation, sowohl bei den weiblichen Tieren ($r = 0.99$) als auch bei den Männchen ($r = 0.97$), wobei erstere bei gleicher Feuchtmasse eine höhere Körperfettmasse aufweisen.

Betrachtet man die Korrelation zwischen der Feuchtmasse und dem Körperfettgehalt, zeigt sich eine größere Variabilität der individuellen Daten, dennoch sind die Werte der männlichen ($r = 0.85$) und weiblichen ($r = 0.94$) Tieren bis zu einem Körperfettgehalt von 50% eng miteinander korreliert ($P < 0.001$; Abb. 8B). Die Männchen der untersuchten Gruppe weisen jedoch in der Regel nicht mehr als 40% Körperfett auf. Die Weibchen erreichen einen deutlich höheren Körperfettgehalt als die Männchen, Werte von 60% Körperfettgehalt werden jedoch nicht überschritten. Dieser Wert markiert den maximalen Anteil an Fettspeicher in Bezug auf die Körpermasse, den Tiere erreichen können. Dieses stellt sich als eine zur X-Achse parallele Sättigung der Kurve dar.

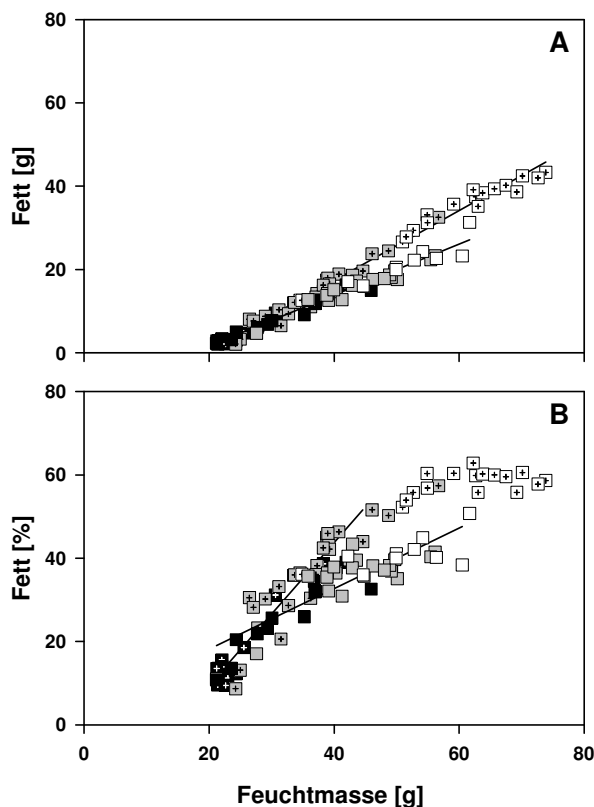


Abb. 8: Korrelation zwischen Körperfettmasse (A), bzw. Körperfettgehalt (B) und der Feuchtmasse von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) 9 Monate alten MC4R-defizienten Mäusen. Die Regressionen für Weibchen (Symbol mit Kreuz) und Männchen wurden getrennt berechnet. Regressionskoeffizienten: Weibchen $r = 0.99$ (A), $r = 0.94$ (B); Männchen $r = 0.97$ (A), $r = 0.85$ (B). Es wurden nur Tiere in die Regression einbezogen, die einen Körperfettgehalt unter 50% hatten, da es bei höheren Werten zu einem annähernd X-Achsen parallelen Kurvenverlauf kam.

Die visuelle Kontrolle der Verteilung der unterschiedlichen Genotypen entlang der Regressionsgerade der Weibchen entspricht der Erwartung, dass Wildtypen einen geringeren Körperfettgehalt aufweisen als MC4R-defiziente Mäuse. Der größte Anteil der $-/-$ MC4R-defizienten Weibchen liegt wie erwartet im Sättigungsbereich der Kurve. Diese stark adipösen Tiere haben die Grenze eines maximal möglichen Anteils an Körperfett erreicht. Die Übergänge zwischen den verschiedenen Genotypen sind fließend. Bei den Männchen zeigt sich bei der Verteilung der Genotypen entlang der Regressionsgeraden eine größere Überlappung als bei den Weibchen.

3.2.4 Auswirkungen des Genotyps und des Geschlechts auf die Körperzusammensetzung

Ein möglicher Einfluss des Genotyps bzw. des Geschlechts der 9 Monate alten Mäuse auf die Körperzusammensetzung wurde mit einer 2-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Der Gesamteffekt der beiden Faktoren auf die Körperzusammensetzung und eine mögliche Interaktion zwischen Geschlecht und Genotyp sind in Tab. VI dargestellt, die für Männchen und Weibchen getrennt resultierenden gewichteten Mittelwerte (\pm SEM) zeigt die Abb. 9. Der Genotyp hat einen hochsignifikanten Einfluss auf die Körperzusammensetzung der 9 Monate alten Mäuse, mit steigender Gendosis nehmen alle untersuchten Parameter zu ($+/+ < +/- < -/-$; nur für FFDM der Weibchen $+/+ = +/- < -/-$ und für Körperfettgehalt der Männchen $+/+ < +/- = -/-$).

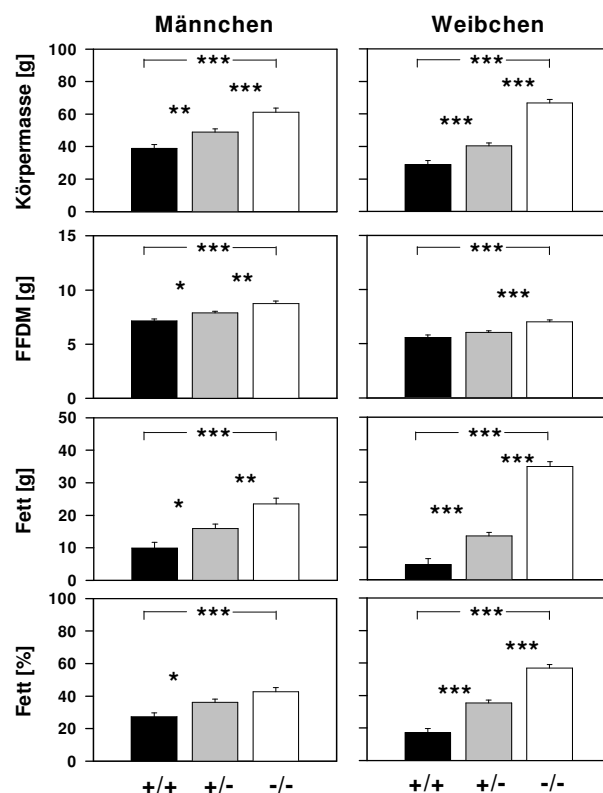


Abb. 9: Mittelwerte (\pm SEM) der Körperzusammensetzung von 9 Monate alten Wildtypen ($+/+$, schwarz); heterozygoten ($+/-$, grau) und homozygoten ($-/-$, weiß) MC4R-defizienten Weibchen (linke Spalte) und Männchen (rechte Spalte). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer 2-faktoriellen ANOVA (Genotyp und Geschlecht als Faktoren) erhoben (siehe Tab. VI). FFDM: Fettfreie Trockenmasse. Die Sterne geben die Signifikanz der Unterschiede zwischen den betreffenden Genotypen im post-hoc Test (Bonferroni) an. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Ein signifikanter Geschlechtsunterschied konnte im Körpergewicht (Männchen > Weibchen) und in der FFDM (Männchen > Weibchen) gezeigt werden (Tab. VI). Auf Körperfettmasse und -gehalt hatte das Geschlecht hingegen keinen signifikanten Gesamteinfluss, jedoch ergab sich ebenso wie für das Körpergewicht eine Interaktion zwischen den beiden betrachteten Faktoren. Diese Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht erlaubt auch bei einem nicht signifikanten Gesamteffekt den Einsatz von *post-hoc* Tests zur Analyse eines vom Genotyp-abhängigen Geschlechtsunterschied. Diese Tests ergeben für die Fettmasse und den Körperfettgehalt einen hochsignifikanten Geschlechtsunterschied zwischen weiblichen und männlichen *+/+* und *-/-* Tieren. Bei den Wildtypen weisen die Weibchen eine geringere Fettmasse und einen niedrigeren Körperfettgehalt auf als die Männchen, während bei den *-/-* Tieren die Weibchen signifikant höhere Werte für Körperfettmasse und -gehalt als die *-/-* Männchen zeigen. Die *+/+* Weibchen und Männchen zeigen ähnliche Werte für Körperfettmasse und -gehalt, die bei beiden Geschlechtern zwischen den *+/+* und *-/-* Tieren liegen. Bei der Körpermasse hingegen ergeben sich bei den Wildtypen und den *+/+* Mäusen niedrigere Werte für die Weibchen, während bei den *-/-* Tieren kein signifikanter Geschlechtsunterschied besteht.

	Körpergewicht [g]	FFDM [g]	Fett [g]	Fett [%]
Genotyp	***	***	***	***
Geschlecht	*	***	ns	ns
Genotyp x Geschlecht	**	ns	***	***

Tab. VI: Dargestellt ist der Gesamteinfluss der Faktoren Genotyp und Geschlecht auf die Körperzusammensetzung von 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen, der mit Hilfe einer 2-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt wurde. Genotyp x Geschlecht beschreibt die Interaktion zwischen den beiden Faktoren. FFDM: Fettfreie Trockenmasse. ns: nicht signifikant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Schlussfolgerung:

Die Körperzusammensetzung der 9 Monate alten Tiere wird entscheidend vom Genotyp beeinflusst. Sowohl weibliche als auch männliche *-/-* Mäuse weisen eine hochsignifikante Zunahme der Körpermasse, der FFDM, der Körperfettmasse und des Körperfettgehaltes gegenüber den Wildtypen auf. Ein Heterozygoten-Effekt¹⁹ wird ebenfalls bei fast allen untersuchten Parametern beobachtet. Ein Genotypeinfluss macht sich bei MC4R-defizienten Mäusen erstmals bei 35 Tage alten Mäusen bemerkbar, während ein Heterozygoten-Effekt sich

¹⁹ Der Begriff des "Heterozygoten-Effekt" wird für einen signifikanten Unterschied zwischen Heterozygoten und Wildtypen verwendet.

ab einem Alter von 56 Tagen auf die Körperzusammensetzung auswirkt (Weide et al., 2003). 9 Monate alte Männchen haben eine signifikant höhere Körpermasse und FFDM als die Weibchen. Ein Geschlechtsunterschied für Körperfettmasse und Körperfettgehalt kann bei den Wildtypen und den homozygoten MC4R-defizienten Tieren gezeigt werden. Dabei erreicht die Mehrzahl der -/- Weibchen einen maximal möglichen Körperfettgehalt von 60%. Ein geschlechtsbedingter Einfluss auf die Körperzusammensetzung von MC4R-defizienten Mäusen findet sich ab einem Alter von 21 Tagen und nimmt mit zunehmendem Alter zu (Weide et al., 2003).

3.2.5 Körperfett und Plasmaleptingehalt

Die Beziehung zwischen Körperfettmasse bzw. -gehalt und dem Leptinspiegel im Blutplasma wurde mithilfe von Regressionsanalysen nach Geschlechtern getrennt untersucht. Die Plasmaleptinkonzentration ist in der linearen Darstellung bei Weibchen und Männchen eng mit der Körperfettmasse korreliert ($P < 0.001$; Abb. 10A, C, folgende Seite). Dieser Befund bestätigt den bekannten proportionalen Zusammenhang zwischen den beiden Parametern (Ahima et al., 2000; Cheung et al., 1997). Zwischen den beiden Geraden besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in Steigung und Y-Achsenabschnitt, so dass weibliche und männliche Tiere bei gleicher Fettmasse in der Regressionsanalyse denselben Plasmaleptinspiegel aufweisen.

Betrachtet man den Plasmaleptingehalt im Verhältnis zum Körperfettgehalt, so stellt sich diese Beziehung als eine exponentielle Wachstumskurve ($P < 0.001$) dar (Abb. 10B, D). Mit zunehmendem Körperfettgehalt steigt der Plasmaleptinspiegel überproportional bei den weiblichen und männlichen Tieren an. Interessanterweise weisen die individuellen Plasmaleptinwerte der weiblichen -/- Tieren, die den Maximalgehalt von 60% Körperfettgehalt erreicht haben (siehe 3.2.3), große Unterschiede und eine breite Streuung auf, der überproportionale Anstieg wird bei diesen Tieren besonders deutlich.

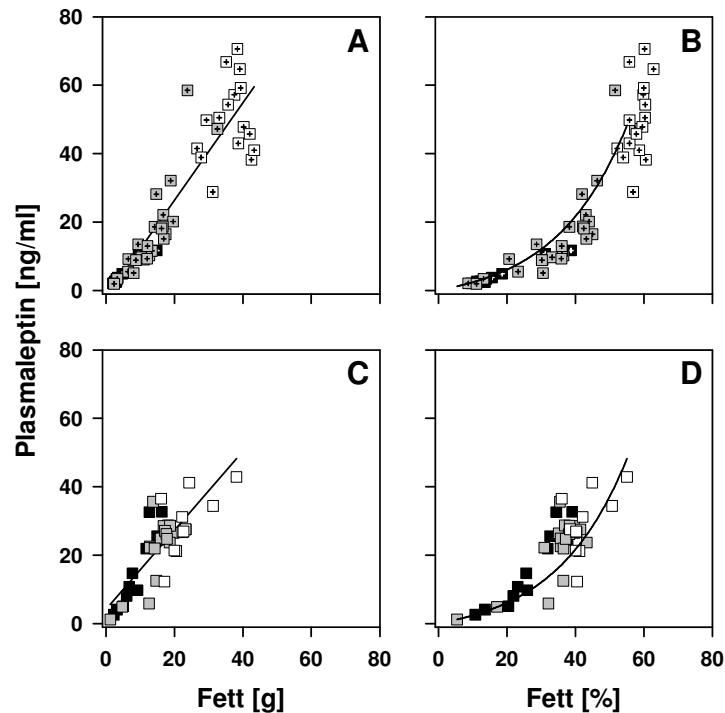


Abb. 10: Korrelation zwischen der Körperfettmasse (A, C; linear) bzw. dem Körperfettgehalt (B, D; exponentiell) und dem Plasmaleptinspiegel von 9 Monate alten weiblichen (A, B: Symbol mit Kreuz) und männlichen (C, D) Mäusen. Wildtypen (+/+ , schwarz); heterozygote (+/-, grau) und homozygote (-/-, weiß) MC4R-defiziente Tiere. Regressionskoeffizienten: $r = 0.92$ (A); $r = 0.93$ (B); $r = 0.88$ (C); $r = 0.90$ (D).

Betrachtet man diese Beziehung nun in halb-logarithmischer Darstellung, so ergibt sich eine hochsignifikante lineare Korrelation ($P < 0.001$; Abb. 11). Beide Geraden sind parallel zueinander verschoben ($P < 0.001$ für einen Unterschied im Y-Achsenabschnitt), wobei die Regressionsgerade der Männchen ($r = 0.88$) oberhalb der Gerade der Weibchen ($r = 0.97$) liegt. Bei gleichem Körperfettgehalt erreicht der Plasmaleptinspiegel der männlichen Tiere also höhere Werte als bei den Weibchen.

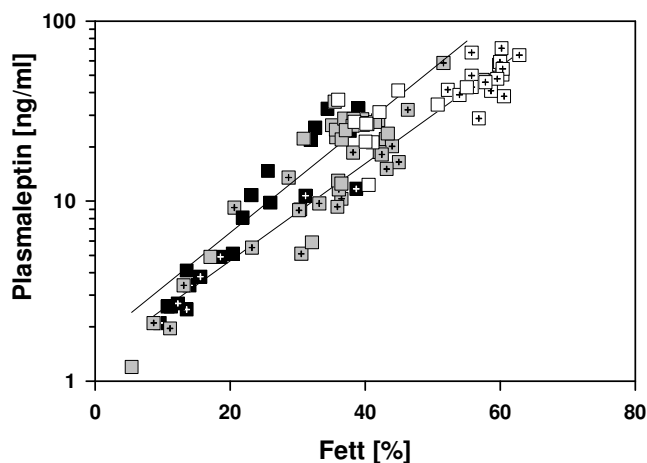


Abb. 11: Korrelation zwischen dem Körperfettgehalt und dem Plasmaleptinspiegel von 9 Monate alten weiblichen (Symbol mit Kreuz) und männlichen Mäusen in halb-logarithmischer Darstellung. Wildtypen (+/+ , schwarz); heterozygote (+/-, grau) und homozygote (-/-, weiß) MC4R-defiziente Tiere. Weibchen: $r = 0.97$; Männchen: $r = 0.88$.

3.2.6 Körperfett und Plasmainsulingehalt

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Plasmainsulinspiegel und der Körperfettmasse (Baskin *et al.*, 1999b) wurde ebenfalls untersucht, ist jedoch hier nicht graphisch dargestellt. Bei den untersuchten 9 Monate alten Weibchen ergab sich eine exponentielle Wachstumskurve ($P < 0.001$), also ein überproportionaler Zusammenhang zwischen Insulin und der Körperfettmasse. Die Plasmainsulinwerte der Männchen scheinen bei zunehmender Körperfettmasse ebenfalls überproportional anzusteigen, doch ist dieser Zusammenhang nicht signifikant. Vergleichbare Verhältnisse ergeben sich für die exponentielle Beziehung zwischen dem Körperfettgehalt und der Plasmainsulinkonzentration (ebenfalls nicht dargestellt). Bei den weiblichen Tieren ergibt sich eine exponentielle Wachstumskurve ($P < 0.001$), die Männchen weisen ebenfalls überproportionale Insulinwerte im Verhältnis zum Körperfettgehalt auf, die jedoch keinen signifikanten Zusammenhang ergeben.

Abbildung 12 zeigt die Beziehung zwischen Körperfettmasse bzw. -gehalt und dem Plasmainsulinspiegel in halb-logarithmischer Darstellung. Hier ergibt sich sowohl bei den Weibchen ($r = 0.85$) als auch bei den Männchen ($r = 0.67$) ein signifikanter linearer Zusammenhang ($P < 0.001$; Abb. 12A, C). Auch für die Korrelation zwischen dem Plasmainsulinspiegel und dem Körperfettgehalt ergibt sich ein vergleichbarer Zusammenhang (Weibchen $r = 0.79$ und Männchen $r = 0.73$; Abb. 12B, D).

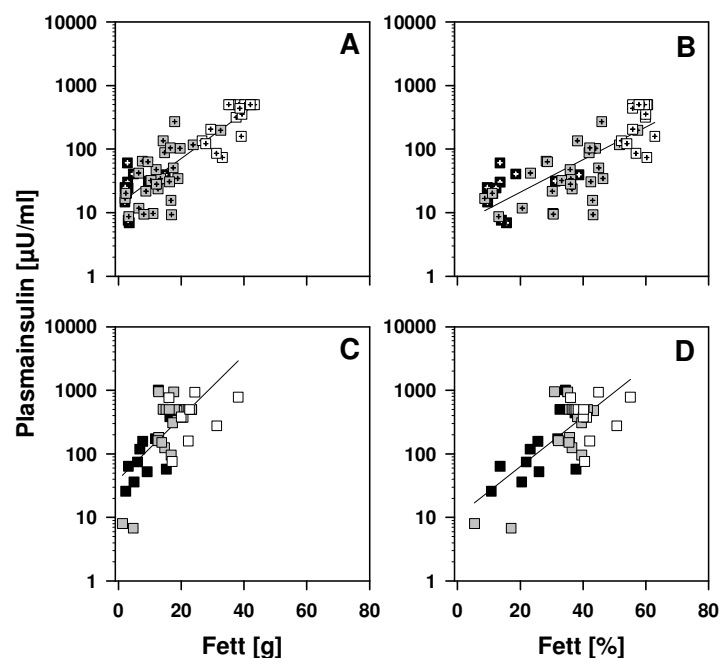


Abb. 12 (vorhergehende Seite): Korrelation zwischen der Körperfettmasse (A, C) bzw. dem Körperfettgehalt (B, D) und dem Plasmainsulinspiegel von 9 Monate alten weiblichen (Symbol mit Kreuz) und männlichen Wildtypen (+/+, schwarz), heterozygoten (+/-, grau) und homozygoten (-/-, weiß) MC4R-defizienten Mäusen in halb-logarithmischer Darstellung. Regressionskoeffizienten: $r = 0.85$ (A); $r = 0.79$ (B); $r = 0.67$ (C); $r = 0.73$ (D).

3.2.7 Auswirkungen des Genotyps und des Geschlechts auf die Plasmakonzentration von Leptin und Insulin

Ein möglicher Einfluss des Genotyps bzw. des Geschlechts der 9 Monate alten Mäuse auf die Plasmaleptinspiegel und die Plasmainsulinkonzentration wurde mit einer 2-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Der Gesamteffekt der beiden Faktoren auf diese Hormone und eine mögliche Interaktion zwischen Geschlecht und Genotyp sind in Tab. VII dargestellt, die für Männchen und Weibchen resultierenden gewichteten Mittelwerte (\pm SEM) zeigt die Abb. 13A. Der Gesamteffekt des Genotyps ist für beide Hormone hochsignifikant.

	Plasmaleptin [ng/ml]	Plasmainsulin [μ U/ml]
Genotyp	***	***
Geschlecht	ns	***
Genotyp x Geschlecht	***	ns

Tab. VII: Dargestellt ist der Gesamteinfluss der Faktoren Genotyp und Geschlecht auf die Konzentration von Leptin und Insulin im Blut von 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Tieren, der mit Hilfe einer 2-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt wurde. Genotyp \times Geschlecht beschreibt die Interaktion zwischen den beiden Faktoren. ns: nicht signifikant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Für Insulin ergab sich zusätzlich ein hochsignifikanter Geschlechtsunterschied (Tab. VII), (Männchen > Weibchen), während ein Gesamteffekt des Geschlechts für den Plasmaleptingehalt nicht gezeigt werden konnte. Es ergab sich jedoch für den Plasmaleptinspiegel eine signifikante Interaktion mit dem Genotyp. Der daraufhin durchgeführte *post-hoc* Test zeigte einen hochsignifikanten Unterschied bei allen drei Genotypen, wobei die +/+ und +/- Weibchen signifikant niedrigere Plasmaleptinspiegel als die Männchen des entsprechenden Genotyps aufwiesen, die -/- Weibchen hingegen eine signifikant höhere Leptinkonzentration im Plasma hatten als die -/- Männchen (Abb. 13A, folgende Seite).

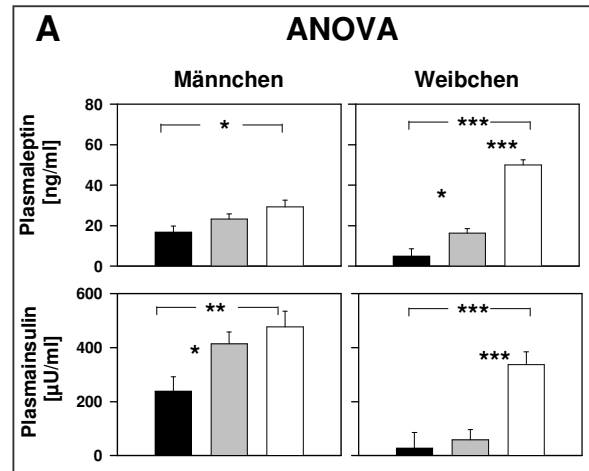


Abb. 13A: Mittelwerte (\pm SEM) des Plasmaleptinspiegels bzw. des Plasmainsulinspiegels von 9 Monate alten Wildtypen (+/+, schwarz), heterozygoten (+/-, grau) und homozygoten (-/-, weiß) MC4R-defizienten Männchen (linke Spalte) und Weibchen (rechte Spalte). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer 2-faktoriellen ANOVA (Genotyp und Geschlecht als Faktoren) erhoben (Tab. VII). Die Sterne geben die Signifikanz der Unterschiede zwischen den betreffenden Genotypen im post-hoc Test (Bonferroni) an. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Bei den Weibchen ergibt sich ein Gendosis-abhängiger Effekt auf die Plasmaleptinkonzentration (+/+ < +/- << -/-), während für die Plasmainsulinkonzentration der Heterozygoten-Unterschied nicht das Signifikanzniveau erreicht (+/+ = +/- << -/-). Bei den männlichen Tieren ist trotz der Gendosis-abhängigen Zunahme des Plasmaleptinspiegels nur der Unterschied zwischen +/+ und -/- Tieren signifikant. Betrachtet man die Plasmainsulinkonzentration bei den Männchen, so unterscheidet sich der Plasmainsulinspiegel von Wildtypen signifikant gegenüber dem der +/- und -/- Tiere, jedoch zeigen +/- und -/- Männchen keinen signifikanten Unterschied (+/+ < +/- = -/-).

Um den Einfluss des Genotyps auf die Hormonkonzentration unabhängig vom Einfluss des Körperfettgehaltes zu ermitteln, wurde eine ANCOVA mit Genotyp und Geschlecht als Faktoren und Körperfettgehalt als Kovariable berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle VIII und Abb. 13B dargestellt. Diese gemeinsame ANCOVA für Männchen und Weibchen ergab nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes keinen signifikanten Gesamteinfluss des Geschlechts auf den Plasmaleptinspiegel, jedoch einen signifikanten Gesamteffekt des Genotyps und eine Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht. Die daraufhin durchgeführte getrennte Analyse für Weibchen und Männchen zeigte einen hochsignifikanten Einfluss des Genotyps auf den

Plasmaleptinspiegel der Weibchen ($P < 0.001$), jedoch keinen Effekt bei den Männchen. Der *post-hoc* Test bei den Weibchen ergab einen signifikanten Unterschied in der Plasmaleptinkonzentration zwischen den $+/+$ und den $-/-$ ($P < 0.05$) sowie zwischen den $+/-$ und $-/-$ Tieren ($P < 0.001$), während der zuvor beobachtete Heterozygoten-Effekt nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes nicht mehr bestand.

	Plasmaleptinkonzentration			Plasmainsulinkonzentration		
	Weibchen + Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen + Männchen	Weibchen	Männchen
Fett %	***	***	***	*	ns	ns
Geschlecht	ns			***		
Genotyp	*	***	ns	ns	ns	ns
Geschlecht x Genotyp	**			ns		

Tab. VIII: Ergebnisse der Kovarianzanalyse (ANCOVA) mit Plasmaleptin bzw. Plasmainsulin als abhängige Variable, Genotyp und Geschlecht als Faktoren sowie Körperfettgehalt als Kovariable von 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Tieren. Dargestellt ist der Gesamteffekt von Genotyp und Geschlecht auf die Plasmaleptinkonzentration von Weibchen und Männchen gemeinsam (erste Spalte), von Weibchen (zweite Spalte) und Männchen (dritte Spalte). Die Zeile Geschlecht x Genotyp beschreibt die Interaktion der beiden Faktoren. ns: nicht signifikant, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Die Ergebnisse der gemeinsamen ANCOVA für den Plasmainsulinspiegel der Männchen und Weibchen mit den Faktoren Genotyp und Geschlecht sowie dem Körperfettgehalt als Kovariable sind ebenfalls in Tab. VIII und Abb. 13B dargestellt (folgende Seite). Auch nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf den Plasmainsulinspiegel ($P < 0.001$), dagegen ergab sich kein signifikanter Genotypunterschied und keine Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht. Bei getrennter ANCOVA für den Plasmainsulinspiegel der Männchen und Weibchen konnten kein signifikanter Genotypeneffekt und kein signifikanter Einfluss der Kovariablen, im Gegensatz zu der gemeinsamen ANCOVA, nachgewiesen werden.

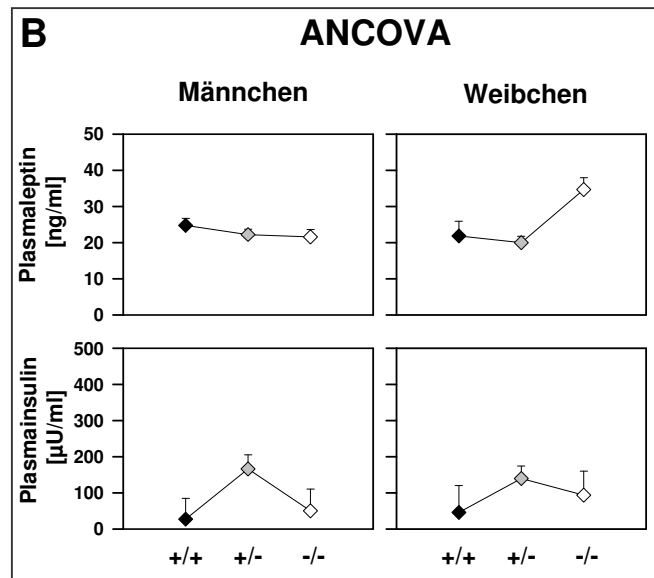


Abb. 13B: Ergebnisse der Kovarianzanalyse (ANCOVA) derselben Tiere mit den Faktoren Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinspiegel nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes. Die Ergebnisse sind als kleinste mittlere Quadrate mit ihrer Standardabweichung dargestellt. Die Gesamteffekte der ANCOVA sind in Tab. VIII gezeigt.

3.2.8 Beziehung zwischen der Leptin- und Insulinkonzentration im Plasma

Der Zusammenhang zwischen den beiden untersuchten zirkulierenden Hormonen wurde mithilfe von Regressionsanalysen untersucht. Um die Beziehung zwischen den beiden Hormonen darzustellen, wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt, da der Plasmainsulinspiegel sowohl zur Körperfettmasse als auch zum Körperfettgehalt nur in der halb-logarithmischen Darstellung signifikant korreliert war, und auch der Plasmaleptinspiegel in der Beziehung zum Körperfettgehalt in der halb-logarithmischen Darstellung einen linearen Zusammenhang ergab (siehe Abb. 11, 12). Die Hormonkonzentrationen sind in der doppelt-logarithmischen Darstellung sowohl bei den Weibchen ($r = 0.81$) als auch bei den Männchen ($r = 0.82$) miteinander korreliert ($P < 0.001$; Abb. 14, folgende Seite). Ein Vergleich der beiden Regressionsgeraden ergab keinen signifikanten Unterschied in der Beziehung zwischen den untersuchten Hormonen.

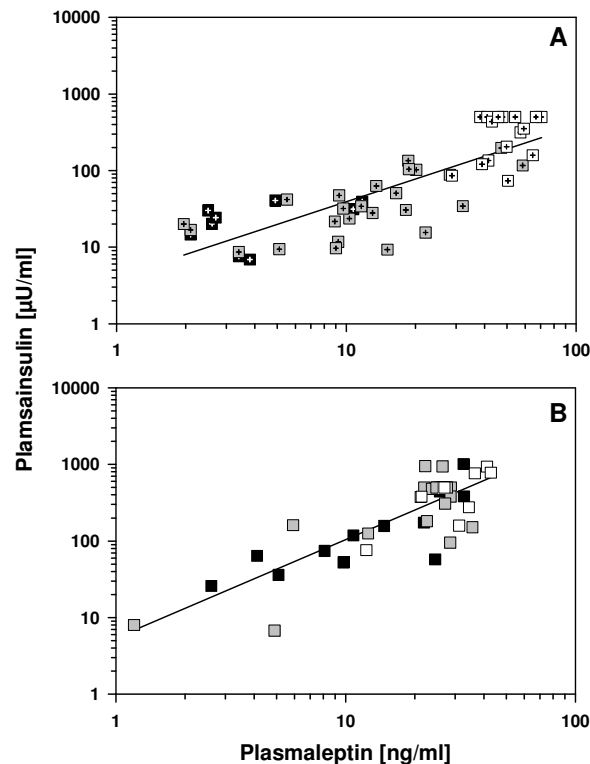


Abb. 14: Korrelation zwischen dem Plasmaleptin- und dem Plasmainsulinspiegel von 9 Monate alten weiblichen (A; $r = 0.81$) und männlichen (B; $r = 0.82$) Wildtypen (+/+, schwarz), heterozygoten (+/-, grau) und homozygoten (-/-, weiß) MC4R-defizienten Mäusen in doppelt-logarithmischer Darstellung.

Schlussfolgerung:

Die Plasmaleptinkonzentration steigt bei 9 Monate alten Mäusen proportional zur Fettmasse an, während die Beziehung zum Körperfettgehalt eine exponentielle Zunahme zeigt. Im Gegensatz dazu steigt die Plasmaleptinkonzentration bei jüngeren Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen bis zu einem Alter von 56 Tagen sowohl mit zunehmender Fettmasse als auch mit zunehmendem Fettgehalt proportional an (Weide et al., 2003). Die Plasmaleptinkonzentration von 9 Monate alten Mäusen wird nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes nur bei den weiblichen Tieren signifikant durch den Genotyp beeinflusst, bei jüngeren Tieren lässt sich jedoch kein Einfluss des Genotyps auf die Plasmaleptinkonzentration nachweisen (Weide et al., 2003). Zwischen Körperfettmasse bzw. Fettgehalt und dem Insulinspiegel besteht in halb-logarithmischer Darstellung eine lineare Korrelation. Der Plasmainsulinspiegel männlicher Mäuse ist auch nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes signifikant höher als der der Weibchen. Ein Einfluss des Genotyps auf die Plasmainsulinkonzentration lässt sich nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes nicht nachweisen.

3.3 Untersuchung der Neuropeptidexpression im ARC bei 9 Monate alten Tieren im Verhältnis zu den jüngeren Tieren

3.3.1 Einfluss systemischer Parameter auf die Neuropeptidexpression

Die Neuropeptidexpression im ARC von 9 Monate alten Tieren wurde im Verhältnis zu den jüngeren Tieren betrachtet. Dazu wurden die Expressionsdaten beider Altersgruppen gemeinsam standardisiert und in ihrer Korrelation zum Körperfettgehalt aufgetragen (Abb. 15, folgende Seite). Um die Darstellung übersichtlicher zu machen, wurden die Werte der 35 und 56 Tage alten Tiere (siehe Abb. 2 bis 5 C, D) durch ihre 95% Konfidenzintervalle dargestellt. Die Werte der 9 Monate alten Tiere sind individuell abgebildet, da bei dieser Altersgruppe, im Gegensatz zu den jüngeren Tieren, zwischen dem Körperfettgehalt und den Expressionsdaten der untersuchten Neuropeptide keine Korrelation mehr besteht. Eine beträchtliche Anzahl der 9 Monate alten MC4R-defizienten Mäuse (v.a. -/-) weist einen höheren Körperfettgehalt (35 bis 60%) als die jüngeren Tiere auf, obwohl sich der Körperfettgehalt der 9 Monate alten Tiere sich zwischen 5 und 35% erheblich mit den Werten der jüngeren Tiere (35 bis 56 Tage alt) überschneidet.

Die NPY Expression (Abb. 15A) der älteren Tiere liegt zwar im gleichen Bereich wie bei den jüngeren Mäusen (ca. 1,5 bis -2 standardisierte IOD), wenn jedoch die Korrelation zum Körperfettgehalt in Betracht gezogen wird, liegen die Expressionsdaten der 9 Monate alten Tiere über der Regressionsgeraden für die 35 und 56 Tage alten Mäuse. Betrachtet man die POMC Expression (Abb. 15B) der älteren Tiere, so liegen die Werte unabhängig vom Genotyp unterhalb (Messbereich 1 bis -3 standardisierte IOD) des Messbereiches für die jungen Mäuse (Messbereich ca. 1,5 bis -1 standardisierte IOD). Bei Betrachtung der Korrelation mit dem Körperfettgehalt wird dies noch deutlicher.

Die AGRP Expressionswerte (Abb. 15C) und der Körperfettgehalt der älteren Tiere korrelieren in demselben Intervall wie bei den jüngeren Mäusen bis zu einem Wert von 35% Körperfettgehalt. 9 Monate alte Tiere mit einem höheren Körperfettgehalt weisen hingegen deutlich höhere AGRP-mRNA Spiegel auf (-0,5 bis 3 standardisierte IOD), diese Tendenz ähnelt den Befunden, die für das koexprimierte NPY gefunden wurden. Auf der anderen Seite liegt die CART Expression (Abb. 15D) der 9 Monate alten Wildtypen unterhalb der Werte der jüngeren Tiere, die Daten der homozygoten Tiere liegen hingegen sowohl bei den jüngeren als auch bei den 9 Monate alten Mäusen größtenteils in demselben Messbereich.

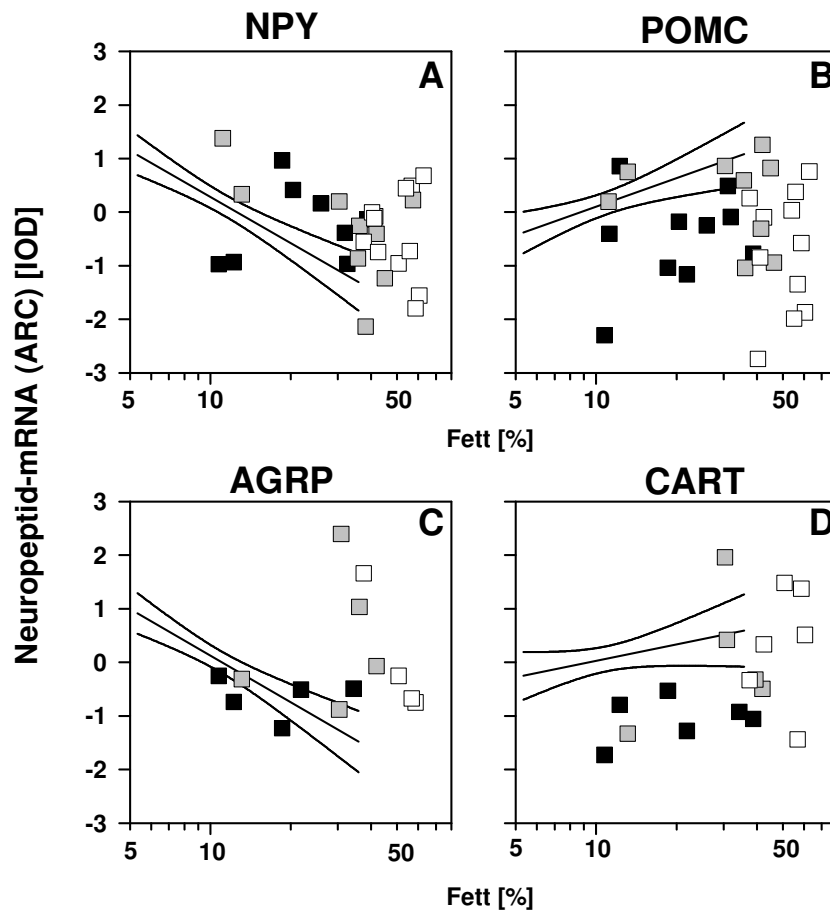


Abb. 15: Korrelation zwischen der Expression von Neuropeptid Y (NPY A), Pro-Opiomelanokortin (POMC B), Agouti-related protein (AGRP C) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART D) im Nukleus arcuatus (ARC) und dem Körperfettgehalt von Tieren der Versuchsgruppen II bis I3 (AGRP und CART) bzw. II bis I4 (NPY und POMC). Die dargestellte Einheit dient nur dem relativen Vergleich. Dargestellt sind die Ergebnisse der integrierten optischen Dichte (IOD)-Messung nach Poolen und Standardisieren der Werte. Die Regressionen der 35 und 56 Tage alten Tiere sind aus Gründen der Übersicht nur mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt (siehe Text). Die Werte der 9 Monate alten Tiere (Quadrat) sind individuell dargestellt. Die Genotypen wurden farblich gekennzeichnet: Wildtypen: +/+, schwarz; Heterozygote: +/-, grau; Homozygote: -/-, weiß.

Ergänzend zu den oben aufgeführten Befunden wurde der Zusammenhang zwischen der Neuropeptidexpression und dem Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinspiegel untersucht (nicht dargestellt). Im Gegensatz zu den jüngeren Tieren zeigten die 9 Monate alten Tiere keine Korrelation zwischen diesen systemischen Parametern und der Neuropeptidexpression. Die graphische Darstellung zeigt die Ähnlichkeit mit der Abbildung der Korrelation zwischen dem Körperfettgehalt und der Neuropeptidexpression.

Schlussfolgerung:

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Alter von 9 Monaten keine signifikante Korrelation mehr besteht zwischen der Expression der untersuchten Neuropeptide einerseits und dem Körperfettgehalt, dem Plasmaleptinspiegel bzw. Plasmainsulinspiegel andererseits. Die zentrale Gegenregulation, die bei den jüngeren Tieren in Reaktion auf eine übermäßige Fettdeposition gefunden wurde, scheint aufgehoben zu sein.

3.3.2 Einfluss des Genotyps auf die Neuropeptidexpression

Die statistische Auswertung der Daten mittels ANCOVA (Genotyp als Faktor und Körperfettgehalt als Kovariable) ergab bei den 9 Monate alten Tieren im Gegensatz zur jüngeren Vergleichsgruppe (siehe 3.1.1) keinen signifikanten Einfluss des Genotyps auf die Expression von NPY, POMC und CART. Lediglich die AGRP Expression wurde durch den Genotyp der Tiere signifikant beeinflusst ($P < 0.05$). Eine parallele statistische Auswertung der Daten mit der Plasmaleptinkonzentration als Kovariable ergab bei den älteren Tieren für keines der untersuchten Neuropeptide eine Abhängigkeit vom Genotyp.

Ein statistischer Einfluss von Alter *und* Genotyp auf die Neuropeptidexpression wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurden die Daten beider Altersgruppen gemeinsam standardisiert und anschließend in einer gemeinsamen ANCOVA (Alter und Gen als Faktoren, Körperfettgehalt als Kovariable) analysiert (siehe 2.4.4). Die Gesamteffekte von Genotyp und Alter auf die Neuropeptidexpression sind in Tabelle IX dargestellt.

Altersgruppe jung und alt	Körperfettgehalt				Plasmaleptinkonzentration			
	NPY	POMC	AGRP	CART	NPY	POMC	AGRP	CART
Alter	**	*	ns	ns	ns	*	ns	ns
Genotyp	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	**
Interaktion	ns	**	**	ns	ns	**	**	ns

Tabelle IX: *Ergebnisse der Kovarianzanalyse (ANCOVA) mit Genotyp und Alter als Faktoren sowie Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinkonzentration als Kovariable nach gemeinsamer Standardisierung beider Altersgruppen. Dargestellt ist der Gesamteffekt von Alter und Genotyp auf die Neuropeptidexpression von 35 und 56 Tagen sowie 9 Monate alten Tieren. Neuropeptid Y: NPY; Pro-Opiomelanokortin: POMC; Agouti-related protein: AGRP; Cocaine-and-Amphetamine-regulated transcript: CART. "Interaktion" beschreibt die Wechselbeziehung zwischen Alter und Genotyp. ns: nicht signifikant, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.*

Abbildung 16 zeigt die Richtung der genotypabhängigen Veränderungen der Neuropeptid-expression in den älteren Tieren im Vergleich zu den jüngeren Mäusen (siehe auch 3.1.1, Abb. 6). Ein signifikanter Altersunterschied innerhalb eines Genotyps ist in der Abbildung durch Sterne gekennzeichnet. Nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes lässt sich zeigen, dass die $-/-$ Mäuse beider Altersstufen die höchste NPY Expression im ARC aufweisen (Abb. 16A). Die 9 Monate alten Tiere aller drei Genotypen exprimieren darüber hinaus deutlich mehr NPY als die jüngeren Tiere. Der Unterschied zu den jüngeren Tieren ist signifikant zwischen den $+/+$ und $-/-$ Tieren. Der Gendosis-abhängige Anstieg der POMC Expression bei den jüngeren Tieren steht in deutlichem Kontrast zu einem generellen Absinken der POMC Expression bei den älteren Mäusen, insbesondere zu einem markanten Abfall der Expression bei den 9 Monate alten $-/-$ Mäusen

(Abb. 16B). Die Tendenz der älteren Tiere, niedrigere Mengen an POMC als die jüngere Vergleichsgruppe zu exprimieren, wird durch den massiven Einbruch bei den $-/-$ Tieren signifikant. Die statistische Auswertung ergab zusätzlich eine signifikante Interaktion zwischen Alter und Genotyp (Tab. IX). Der *post-hoc* Test ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den $-/-$ Tieren der beiden Altersstufen, jedoch keinen signifikanten Unterschied bei den beiden anderen Genotypen.

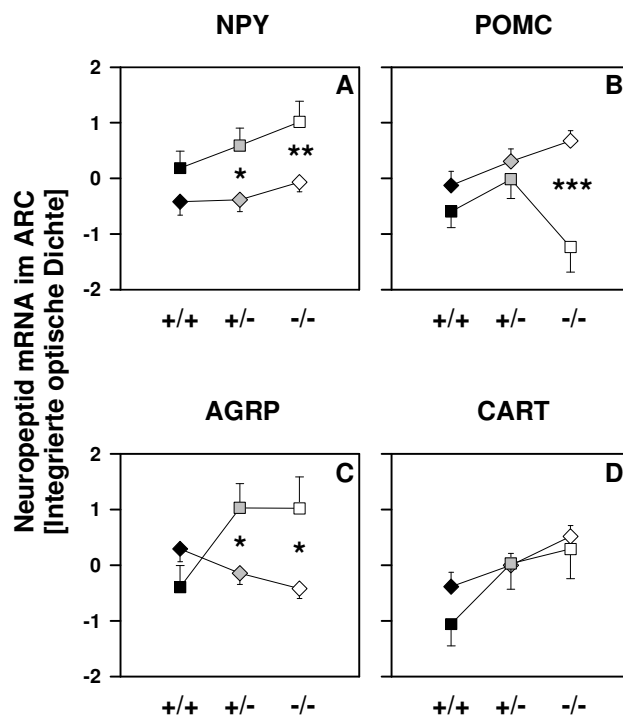


Abb. 16: Ergebnisse der Kovarianzanalyse (ANCOVA) mit Körperfettgehalt als Kovariable sowie Genotyp und Alter als Faktoren. Ausgewertet wurde die standardisierten, gepoolten NPY- (A), POMC- (B), AGRP- (C) und CART- (D) Expressionswerte von 35 und 56 Tage alten Tieren (Raute, Altersgruppe 1) und 9 Monate (Quadrat, 2. Altersgruppe) alten Tieren. Wildtypen ($+/+$, schwarz), Heterozygote ($+/-$, grau) und Homozygote ($-/-$, weiß). Beide Altersgruppen wurden gemeinsam standardisiert, um einen Effekt des Alters deutlich zu machen. Signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen des jeweiligen Genotypen sind durch * markiert (*: $P < 0.005$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$). Dargestellt ist die Summe der kleinsten Quadrate und die Standardabweichung.

Der Effekt des Genotyps auf die AGRP Expression (Abb. 16C) ist bei beiden Altersgruppen ebenfalls unterschiedlich (eine signifikante Interaktion zwischen den beiden Faktoren wurde nachgewiesen). Die Tendenz einer sinkenden Expression mit steigendem Gendefekt bei den jungen Tieren ist bei der älteren Tiergruppe vollkommen aufgehoben, bei den 9 Monate alten Mäusen steigt die AGRP Expression vom $+/+$ zum $-/-$ Tier an ($+/+ < +/- = -/-$). Obwohl weder der Gesamteffekt des Alters noch des Genotyps auf die AGRP Expression signifikant ist (Tab. IX), weist der aufgrund der signifikanten Interaktion von Alter und Genotyp durchgeführte *post-hoc* Test bei den $+/+$ und $-/-$ Tieren eine signifikant höhere AGRP Expression bei den 9 Monate alten Tieren im Verhältnis zur Expression der jüngeren Tiere nach. Der nicht signifikante Gesamteffekt des Alters und des Genotyps wird also durch eine Überkreuzung der standardisierten IOD Werte der jungen und alten Tiere hervorgerufen. Die CART Expression (Abb. 16D) wird im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Neuropeptidexpressionen als einzige in beiden Altersgruppen gleichermaßen vom Genotyp beeinflusst, es findet sich dementsprechend weder ein Gesamteffekt des Alters noch eine Alter-Genotyp Interaktion in der statistischen Auswertung. Es ließ sich jedoch ein Gesamteffekt des Genotyps auf die CART Expression nachweisen (Tab. IX).

Ergänzend wurde eine ANCOVA mit Genotyp und Alter als Faktoren und Plasmaleptinkonzentration als Kovariable berechnet, um den Einfluss des Hormons auf die Neuropeptidexpression herauszupartialisieren. Ein signifikanter Einfluss des Alters wurde nur auf die POMC Expression gefunden; der Genotyp beeinflusst unter Berücksichtigung der Plasmaleptinkonzentration nur die CART Expression. Eine Interaktion zwischen den Faktoren wurde für die Expression von POMC und AGRP festgestellt (Tab. IX).

Schlussfolgerung:

Auch nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes ergab sich ein Einfluss des Alters auf die Neuropeptidexpression im ARC für NPY, POMC und AGRP in den post-hoc Tests. Während die 9 Monate alten Tiere mehr NPY als die Jüngeren exprimieren, kommt es bei den älteren Tieren zu einem Absinken der POMC Expression. Insbesondere wird bei den $-/-$ Tieren ein drastischer Abfall beobachtet. Man könnte vermuten, dass dieser Abfall darauf beruht, dass die POMC Neurone bei den 9 Monate alten Tieren erschöpft sind. Die AGRP Expression ist im Vergleich zu den 35 und 56 Tage alten Mäusen bei den 9 Monate alten $+/+$ und $-/-$ Tieren am höchsten, bei den jüngeren Tieren hingegen exprimieren die Wildtypen die größte Menge an AGRP. CART wird als einziges der untersuchten Neuropeptide in beiden Altersstufen in ähnlicher Intensität exprimiert.

Ein Gesamteinfluss des Genotyps findet sich bei den 9 Monate alten Tieren nach Berücksichtigung des Körperfettgehaltes bzw. des Plasmaleptinspiegels nur auf die CART Expression.

3.3.3 Untersuchung zur Koexpression der Neuropeptide

Eine Koexpression der orexigenen und anorexigenen Neuropeptide ist in der Literatur vielfach beschrieben (Broberger *et al.*, 1998; Shutter *et al.*, 1997; Vrang *et al.*, 1999; Elias *et al.*, 1998), sie ist jedoch nicht immer durchgängig (Dhillon *et al.*, 2000; 2001). Die Betrachtung der Neuropeptide hinsichtlich ihrer Koexpression (N = 70) ist in Abbildung 17 dargestellt. Zwischen der Expression der orexigenen Peptide NPY und AGRP (Abb. 17A) besteht wie erwartet eine signifikant positive Korrelation ($P < 0.001$), die individuellen Werte weisen aber eine deutliche Streuung auf. Betrachtet man die Koexpression von POMC und CART im ARC (Abb. 17B), so ist auch die Expression dieser anorexigenen Signale positiv miteinander korreliert ($P < 0.01$), die Werte streuen aber noch stärker ober- und unterhalb der Regressionsgeraden als bei den orexigenen Neuropeptiden.

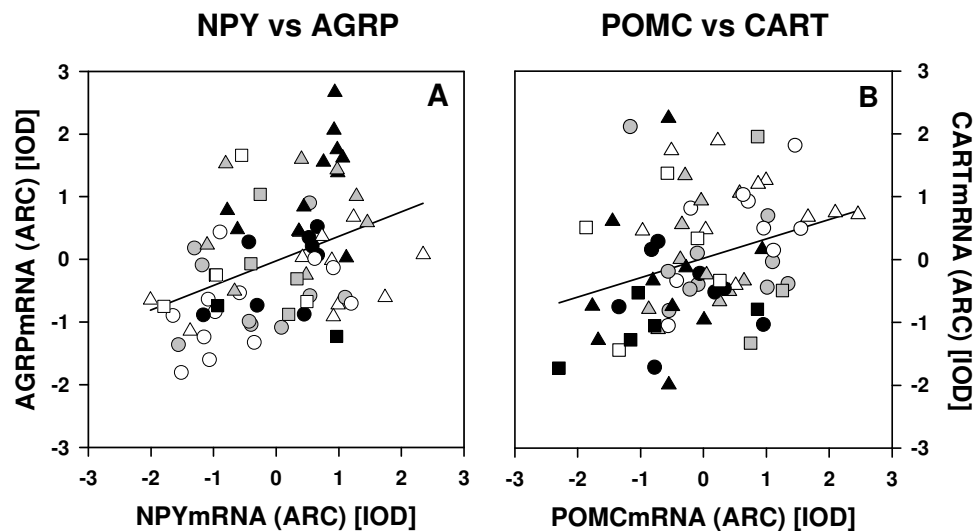


Abb. 17: Korrelation zwischen der Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-related protein (AGRP) Expression (A; $r = 0.40$) bzw. Pro-Opiomelanokortin (POMC) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART) Expression (B; $r = 0.31$) im Nukleus arcuatus (ARC) nach gemeinsamen Standardisieren und Poolen der Daten (I1- I3). Die Wildtypen (+/+, schwarz), heterozygoten (+/-, grau) und homozygoten (-/-, weiß) Tiere waren 35 Tage (Dreieck), 56 Tage (Kreis) und 9 Monate (Quadrat) alt. Dargestellt sind die Ergebnisse der integrierten optischen Dichte (IOD)-Messung. Die dargestellten Einheiten dienen nur dem relativen Vergleich.

3.4 Untersuchung der Neuropeptidexpression im ventromedialen (VMN) und dorsomedialen Nukleus (DMN) von Tieren beider Altersgruppen

Mit Hilfe der radioaktiven *in situ* Hybridisierung konnte in keinem untersuchten Tier eine POMC oder eine AGRP Expression außerhalb des ARC nachgewiesen werden (Abb. 18). Eine CART Expression konnte in jeder Altersgruppe im ARC und in dorsalen Regionen des Hypothalamus, die mit der Lage des DMN übereinstimmen, gezeigt werden (vgl. Abb. 1). Die CART Expression in dieser dorsalen Region wurde densitometrisch bestimmt. Es wurden 35 Tage alte (N = 23), 56 Tage alte (N = 16) und 9 Monate alte Tiere (N = 16) untersucht. Eine ANCOVA der standardisierten Daten zeigte keine Beziehung zwischen der CART Expression und dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel (als Kovariablen) oder den Faktoren Genotyp und Alter (niedrigstes $P = 0.35$, nicht dargestellt).

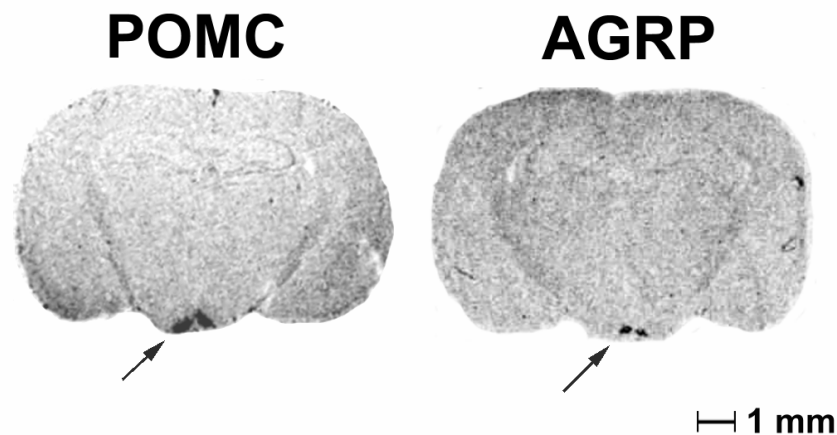


Abb. 18: Pro-Opiomelanokortin (POMC) und Agouti-related protein (AGRP) Expression in 20 μm Frontalschnitten der Gehirne von MC4R-defizienten Mäusen am Beispiel repräsentativer Einzelschnitte von 9 Monate alten homozygoten Tieren. Gezeigt ist das nach Durchführung einer radioaktiven *in situ* Hybridisierung auf dem Röntgenfilm sichtbare Hybridisierungsmuster. Für die spätere quantitative Auswertung wurde nur die integrierte optische Dichte des markanten Hybridisierungssignals im Nukleus arcuatus (Pfeile) quantitativ bestimmt.

Eine altersabhängige Expression im ventromedialen (VMN) und dorsomedialen (DMN) konnte nur für NPY gezeigt werden. Während sich das NPY Signal bei den jüngeren Tieren nur auf den ARC beschränkte (siehe Abb. 1), fand sich bei den 9 Monate alten Mäusen eine NPY Expression nicht nur im ARC, sondern auch im DMN und VMN. Die Autoradiographien deuteten auf einen Zusammenhang zwischen der Stärke des Signals und dem Genotyp der Tiere hin (Abb. 19). Die hohe Intensität des radioaktiven Signals in vielen Präparaten ließ eine selektive Quantifizierung der NPY Expression im DMN und VMN jedoch nicht zu. Aus diesem Grunde wurde an parallelen Gehirnschnitten von einigen Tieren derselben Gruppe eine nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung durchgeführt.

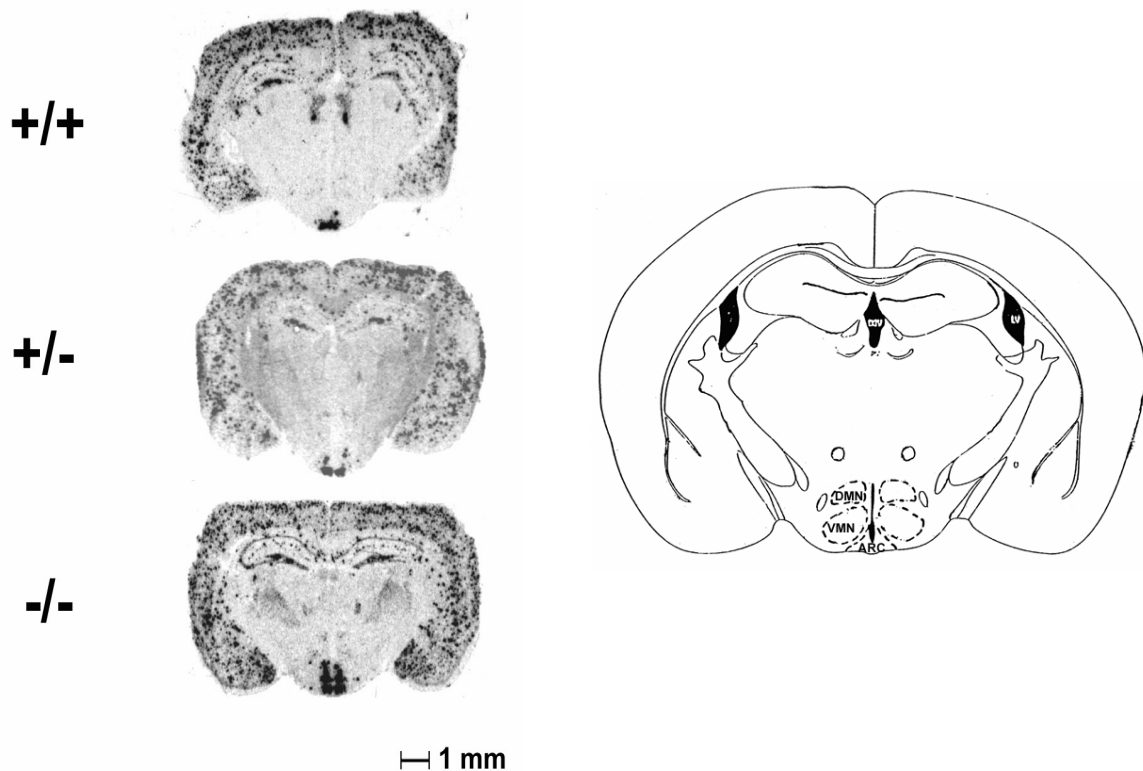


Abb. 19: Neuropeptid Y Expression in 20 µm Frontalschnitte der Gehirne von 9 Monate alten Wildtypen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) MC4R-defizienten Mäusen. Dargestellt ist das, nach Durchführung einer radioaktiven *in situ* Hybridisierung sichtbare Hybridisierungsmuster im Hypothalamus in repräsentativen Einzelschnitten. Das Schema rechts (Vorlage aus Franklin & Paxinos, 1997, Figur 43) stellt die Gebiete des Nukleus arcuatus (ARC), des ventromedialen (VMN) und dorsomedialen (DMN) Nukleus des Hypothalamus dar.

Die nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung bestätigte, dass NPY-exprimierende Zellen im Hypothalamus von 35 und 56 Tage alten Tieren, unabhängig vom Genotyp, nur im ARC, nicht aber im DMN und VMN vorkamen. Bei den 9 Monate alten Mäusen hingegen waren bei allen drei Genotypen auch Neurone im DMN und VMN deutlich markiert. Abbildung 20 zeigt Schnitte einer 56 Tage alten Wildtypmaus (A-C), die mit DIG-markierten Proben hybridisiert wurden, im Vergleich mit korrespondierenden Schnitten einer 9 Monate alten Wildtypmaus (D-F).

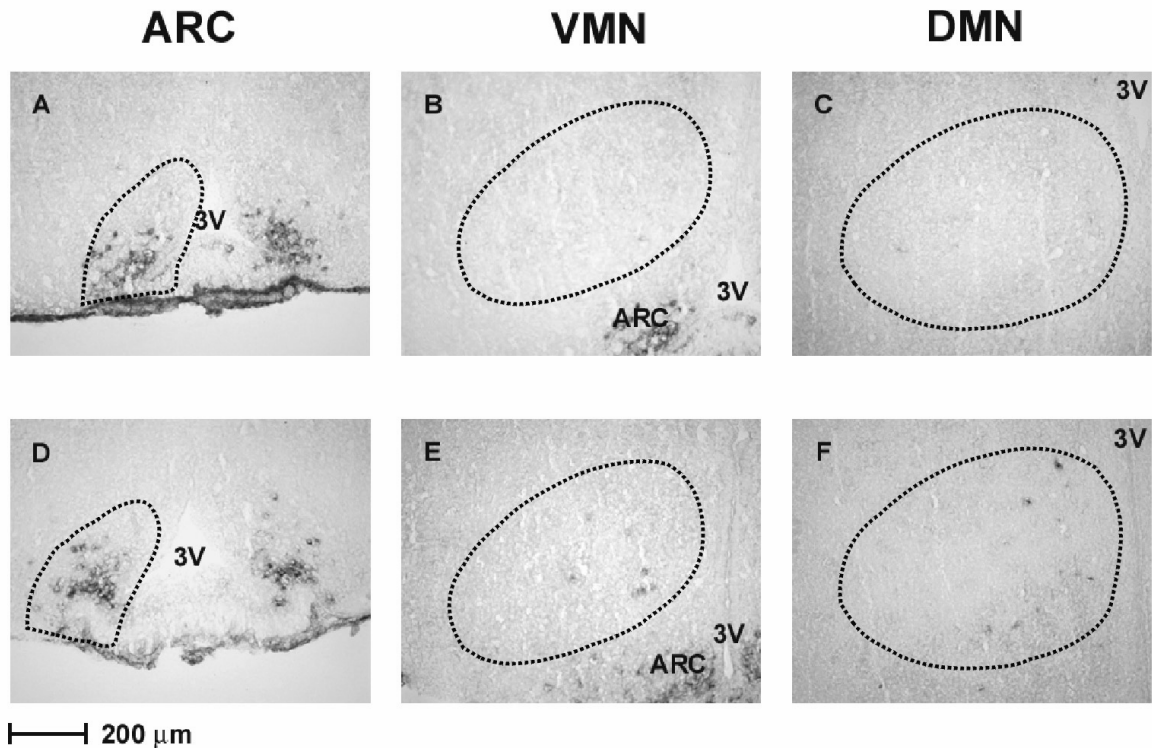


Abb. 20: *Neuropeptid Y Expression in 20 µm Frontalschnitten von Gehirnen einer 56 Tage alten (A-C) und einer 9 Monate alten (E-F) Wildtypmaus (+/+) am Beispiel repräsentativer Einzelschnitte. Gezeigt ist das, nach Durchführung einer nicht-radioaktiven in situ Hybridisierung, im Zytoplasma der Neurone sichtbare Hybridisierungsmuster im Nukleus arcuatus (ARC, links), sowie in den ventromedialen (VMN, Mitte) und dorsomedialen Nuklei (DMN, rechts) des Hypothalamus. 3V: dritter Ventrikel. Die Grenzen der Kerngebiete sind durch gestrichelte Linien angedeutet.*

Bei dem 9 Monate alten +/+ Tier erkennt man NPY-exprimierende Zellen nicht nur im ARC, sondern auch im DMN und VMN. Die im Zytoplasma markierten NPY Neurone im ARC erscheinen unabhängig vom Alter und Genotyp der Tiere dicht zusammengedrängt neben- und übereinander und können aus diesem Grund nicht gezählt werden. Im Gegensatz dazu liegen die markierten Neurone im VMN und DMN relativ isoliert voneinander in beiden Kerngebieten

verteilt, ihre Anzahl kann ohne Probleme durch Auszählen quantifiziert werden. Mithilfe der nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung und zusätzlichen histologischen Färbemethoden (siehe 2.1.2) konnten die Grenzen der Kerngebiete bestimmt werden und sind in der Abbildung durch gestrichelte Linien angedeutet. Abbildung 21 beschreibt den Einfluss des Genotyps auf die NPY Expression im DMN und VMN. Mit zunehmender Gendosis nimmt die Expression des orexigenen Peptids deutlich zu (+/+ = +/- < -/-). Die markierten Neurone wurden in beiden Kerngebieten ausgezählt (N = 6 für jeden Genotyp), da es jedoch keinen Hinweis auf einen unterschiedlichen Anstieg der NPY Expression im VMN oder DMN gab, wurden die Zellzahlen für die weitere statistische Auswertung zusammengefasst. Eine parallele Untersuchung der POMC Expression mithilfe nicht-radioaktiver *in situ* Hybridisierung konnte, wie schon vorher in der radioaktiven Markierung gezeigt, keine POMC Expression in DMN oder VMN nachweisen (nicht dargestellt).

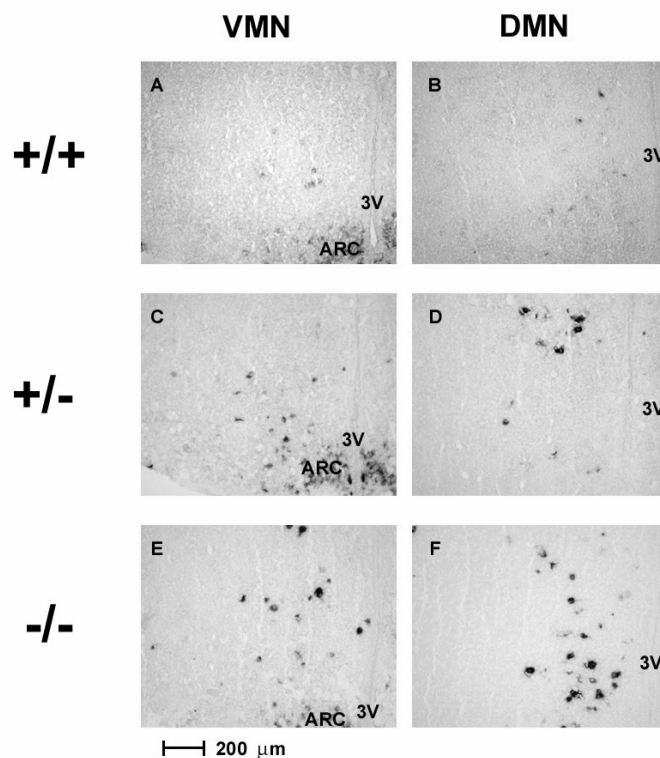


Abb. 21: *Neuropeptid Y Expression in 20 µm Frontalschnitten von Gehirnen von 9 Monate alten Tieren am Beispiel repräsentativer Einzelschnitte: Wildtypmaus (+/+; A, B), heterozygote (+/-; C, D) und homozygote (-/-; E, F) MC4R-defiziente Mäuse. Gezeigt ist das, nach Durchführung einer nicht-radioaktiven in situ Hybridisierung, im Zytoplasma der Neurone sichtbare Hybridisierungsmuster im Nukleus arcuatus (ARC), sowie in den ventromedialen (VMN, links) und dorsomedialen Nuklei (DMN, rechts) des Hypothalamus. 3V: dritter Ventrikel.*

Zur weiteren statistischen Auswertung wurde die Anzahl der NPY-exprimierenden Neurone im DMN und VMN in ein Verhältnis zum Genotyp und dem Körperfettgehalt der Tiere gesetzt (Abb. 22A, folgende Seite). In dem Plot sind die individuellen Werte der 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäuse eingetragen, die Regressionen wurden für jeden Genotyp separat berechnet. Für alle drei Regressionen ergibt sich eine enge Korrelation. Bei allen drei Genotypen ist die Anzahl der NPY-exprimierenden Neurone positiv mit dem Körperfettgehalt korreliert, im Gegensatz zu der negativen Korrelation zwischen der NPY Expression im ARC und dem Körperfettgehalt der jüngeren Tiere. Die Regressionsgeraden der $+/+$ und $+/-$ Tiere (beide $r > 0.9$) sind in Steigung und Y-Achsenabschnitt virtuell identisch, dies erlaubte die Berechnung einer gemeinsamen Regression. Die Gerade der $-/-$ Tiere verläuft hingegen signifikant steiler ($P < 0.05$ für den Unterschied in der Steigung zur gemeinsamen Geraden der $+/+$ und $+/-$ Tiere; nicht dargestellt). Die Ergebnisse der Regressionsanalyse wurden durch eine ANCOVA mit Genotyp als Faktor und Körperfettgehalt als Kovariable ergänzt. Die hochsignifikante positive Korrelation zwischen der Zellzahl und dem Körperfettgehalt ($P < 0.001$) sowie ein signifikanter Genotypeinfluss ($P < 0.05$) auf die Anzahl der NPY-exprimierenden Neurone im VMN und DMN wurden bestätigt. Der *post hoc* Test ergab keinen Heterozygoten-Effekt, aber einen signifikanten Unterschied zwischen der Neuronenanzahl in Wildtypen bzw. $+/+$ und $-/-$ Tieren ($+/+ = +/- < -/-$).

Die Plasmaleptinkonzentration ist ebenfalls eng mit der NPY Expression im VMN und DMN korreliert ($r > 0.9$) (Abb. 22B). Die Regressionen der $+/+$ und $+/-$ Mäuse sind, wie bei der Korrelation mit dem Körperfettgehalt (Abb. 22A), in Steigung und Y-Achsenabschnitt praktisch identisch. Eine gemeinsame Regression dieser beiden Genotypen konnte berechnet werden. Die Regression der $-/-$ Tiere verläuft parallel verschoben und signifikant höher ($P < 0.05$ für den Unterschied im Y-Achsenabschnitt) als die gemeinsame Gerade (nicht dargestellt) der $+/+$ und $+/-$ Mäuse.

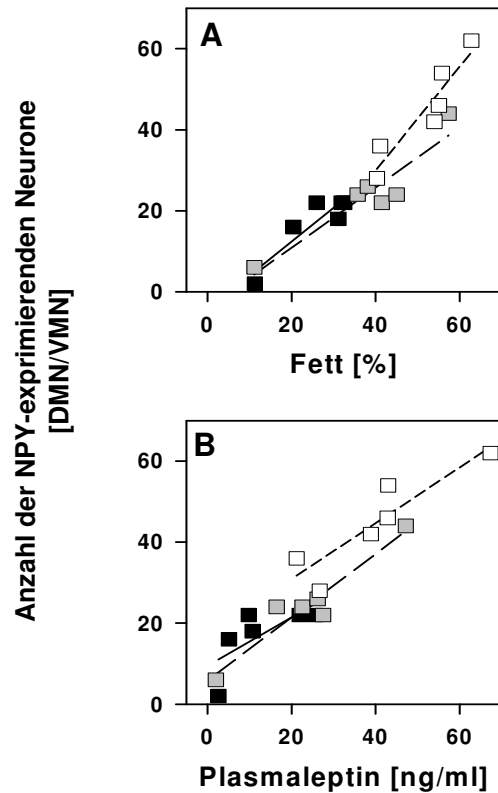


Abb. 22: Lineare Regressionen (alle > 0.9) zwischen der Anzahl der Neuropeptid Y (NPY)-exprimierenden Neurone im ventromedialen (VMN) und dem dorsomedialen (DMN) Nukleus des Hypothalamus von 9 Monate alten Tieren ($N = 18$) und dem Körperfettgehalt (A) bzw. der Plasmaleptinkonzentration (B). Die Regressionen wurden für jeden Genotyp getrennt berechnet: Wildtypen: +/+, schwarze Quadrate, durchgezogene Linie; Heterozygote: +/-, graue Quadrate, lang-gestrichelte Linie; Homozygote: -/-, weiße Quadrate, kurz-gestrichelte Linie. Die Regressionen für die +/+ und +/- Mäusen waren in beiden Beziehungen virtuell identisch und erlaubten die Kalkulation einer gemeinsamen Regressionsgerade (siehe Text).

Schlussfolgerung:

Mithilfe der nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung konnte in 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen eine induzierte Expression von NPY in den, dem ARC nachgeschalteten, ventromedialen und dorsomedialen hypothalamischen Kerngebieten nachgewiesen werden. Die Zahl der NPY-exprimierenden Neurone nimmt visuell mit der Gendosis am MC4r-Defekt zu und ist positiv mit Körperfettgehalt und Plasmaleptinspiegel korreliert. Diese Induktion der NPY Neurone könnte die Folge einer Entkopplung der zentralen Regulationsmechanismen sein (siehe 3.3) und die Hyperphagie der Tiere bedingen, die wiederum die enge Korrelation der NPY Expression mit dem Körperfettgehalt erklären könnte.

4 Diskussion

Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten grundlegende Zusammenhänge zwischen systemischen Parametern und der Expression orexigener und anorexigener Neuropeptide im Hypothalamus von Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen unterschiedlicher Altersstufen erarbeitet werden. Die beiden Altersgruppen, die hinsichtlich ihrer Neuropeptidexpression miteinander verglichen wurden, bestanden aus 35 bzw. 56 Tage alten Tieren, die in der Gruppe der "jüngeren Tiere" zusammengefasst wurden, und 9 Monate alten Mäusen, die im folgenden als "ältere Tiere" bezeichnet werden. Von besonderem Interesse war ein möglicher Einfluss von Genotyp oder Alter der Tiere auf die Neuropeptidexpression. Ergänzend zu diesen neurobiologischen Daten wurde die Körperzusammensetzung sowie die Plasmaleptinkonzentration und –insulinkonzentration in Bezug auf einen möglichen Einfluss von Genotyp und Geschlecht untersucht. Dabei wurden bereits vorliegende Daten von jüngeren Tieren (Weide *et al.*, 2003; Huszar *et al.*, 1997) durch die Analyse einer Gruppe von 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäuse ergänzt. Die Betrachtung dieser systemischen Parameter ist im Zusammenhang mit der zentralen Regulation der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus von besonderer Bedeutung, da der Körperfettgehalt und die untersuchten Hormone als potentiell verändernde Faktoren der Neuropeptidexpression eine Rolle spielen könnten.

4.1 Untersuchung der Neuropeptidexpression im ARC

4.1.1 Einfluss von Körperfettgehalt, Plasmaleptinspiegel und Genotyp auf die Neuropeptidexpression von 35 und 56 Tage alten Tieren

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Neuropeptidexpression im ARC bei den jüngeren Mäusen wesentlich stärker vom Körperfettgehalt bzw. der Plasmaleptinkonzentration beeinflusst wird, als durch Genotyp oder Alter. Aus diesem Grund war es möglich, die Daten der jüngeren Tiere in dieser Arbeit unabhängig von Genotyp oder Alter auf einer gemeinsamen Regressionsgerade darzustellen (Abb. 2-5; Weide *et al.*, 2003). Tiere dieser Alterstufe scheinen unabhängig vom Genotyp dazu in der Lage zu sein, Signale über die Größe ihrer Fettspeicher zu empfangen und die Neuropeptidexpression im Sinne einer zentralen Gegenregulation in Reaktion auf die Größe der Fettdepots zu verändern.

Da jedoch bereits 35 Tage alte +/- Mäuse einen signifikant höheren Körperfettgehalt aufweisen als Wildtypen (Weide *et al.*, 2003), könnten der Körperfettgehalt oder die Plasmaleptinkonzentration, als wesentliche -aber möglicherweise sekundär bedingte- Einflussfaktoren auf die Neuropeptidexpression, primäre Genotypeinflüsse verdecken. Um einen potentiellen primären Effekt des MC4R Defektes auf die Expression der orexigenen und anorexigenen Peptide im ARC nachzuweisen, wurde der Einfluss des Körperfettgehaltes bzw. des Plasmaleptinspiegels auf die Neuropeptidexpression mithilfe einer ANCOVA herauspartialisiert. In der vorliegenden Arbeit lässt sich auf diesem Wege ein signifikanter Genotypeinfluss auf die Expression aller untersuchten Neuropeptide nachweisen (Tab. V), der bei der visuellen Kontrolle der Beziehung zwischen dem Körperfettgehalt und der Neuropeptidexpression nicht zu erkennen ist (Abb. 2-5). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte ANCOVA zeigt durch das Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes die unmittelbare Wirkung der MC4R Defizienz -unabhängig von ihrer Beeinflussung der Fettspeicher- auf die Neuropeptidexpression an (Abb. 6). Dabei versteht sich die Darstellung dieses Effektes (Abb. 6) mathematisch als die Ableitung der Beziehung zwischen der Neuropeptidexpression und dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel der Tiere (Abb. 2-5). Dadurch wird deutlich, ob der Einfluss des Genotyps einen hemmenden oder verstärkenden Einfluss auf die Beziehung zwischen der Neuropeptidexpression und dem untersuchten systemischen Parameter ausübt. Zu bedenken ist jedoch, dass das Herauspartialisieren nur den akuten Effekt des Körperfettgehaltes eliminiert. Eine eventuell chronische Veränderung der Regulation der Neuropeptidexpression durch den Körperfettgehalt bleibt in der ANCOVA unberücksichtigt.

4.1.1.1 Einfluss auf die NPY Expression

In dieser Studie zeigt sich eine negative Korrelation zwischen der NPY Expression und dem Körperfettgehalt bzw. der Plasmaleptinkonzentration (Abb. 2). Die vorherrschende Antwort des NPY Systems im ARC der jüngeren Mäuse aller drei Genotypen beruht auf einer Reduktion der NPY-mRNA Konzentration mit zunehmendem Körperfettgehalt und einer entsprechend ansteigenden Plasmaleptinkonzentration. Verschiedene Untersuchungen sprechen NPY Neurone im ARC als wichtige Ziele von Leptin an (Ahima *et al.*, 2000; Kalra *et al.*, 1999). NPY gilt als der stärkste zurzeit bekannte Hungerstimulator (Clark *et al.*, 1984, 1987). Mercer *et al.* (1996b) wiesen eine Koexpression von LepR-Rb und NPY in Neuronen des ARC nach. Prinzipiell geht man von einer hemmenden Wirkung des Leptins auf die NPY Expression im ARC aus (Stephens *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1996b). Leptin drosselt die Verfügbarkeit von NPY im

Hypothalamus sowohl akut als auch über einen längeren Zeitraum (Kalra *et al.*, 1999). Cowley *et al.* (2001) wiesen *in vitro* eine Hyperpolarisation von NPY Neuronen im ARC durch Leptinapplikation nach. Die NPY Expression im ARC ist in hungernden Tieren und in *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen erhöht, kann jedoch durch eine zentrale Leptinapplikation unterdrückt werden (Schwartz *et al.*, 1996a; Stephens *et al.*, 1995). Die in der vorliegenden Arbeit ohne Berücksichtigung des Genotyps sichtbar werdende negative Korrelation zwischen der NPY Expression und dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel (Abb. 2) bestätigt einen hemmenden Einfluss von Leptin auf die Expression des orexigenen Neuropeptids. Die Suppression des orexigenen Neuropeptids könnte dazu beitragen, einer Vergrößerung der Fettspeicher entgegen zu wirken (Weide *et al.*, 2003).

Durch den signifikanten Genotypeinfluss auf die NPY Expression bei den jüngeren Tieren (Tab. V; Abb. 6A) wird die Veränderung der NPY Expression mit steigendem Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinspiegel (Abb. 2) abgeschwächt, da die gesteigerte NPY Expression bei den *-/-* Tieren der negativen Korrelation zwischen den untersuchten Parametern entgegen wirkt. Der Einfluss des Körperfettgehaltes bzw. des Plasmaleptinspiegels auf die NPY Expression ist jedoch auch unter Berücksichtigung des -die Korrelation abschwächenden Genotypeinflusses- signifikant ($P < 0.001$). Die NPY Expression, die bei den *-/-* Tieren trotz der insgesamt negativen Korrelation zum Körperfettgehalt relativ erhöht ist, beschreibt eine orexigene Komponente im Hypothalamus. Regulatorische Kompensationsmechanismen gegen eine Zunahme der Fettdepots scheinen im Hinblick auf die, eine orexigene Reaktion vermittelnde NPY Expression, bei den *-/-* Tieren bereits im Alter von 35-56 Tagen abgeschwächt zu sein. Eine mögliche Hypothese zur Erklärung dieses Befundes beruht auf der Interaktion von NPY und POMC Neuronen, auf die im Kapitel 4.1.4 näher eingegangen wird.

Studien an *-/-* Mäusen zeigten, dass die MC4R-defizienten Tiere auf eine NPY Injektion in derselben Weise wie Wildtypen mit Futteraufnahme reagieren. Dementsprechend scheint NPY unabhängig oder "down-stream" des MC4R zu funktionieren (Marsh *et al.*, 1999b). Dennoch zeigen bereits junge MC4R-defiziente Tiere trotz der insgesamt negativen Korrelation zwischen Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinspiegel und der Neuropeptidexpression eine Hyperphagie (Weide *et al.*, 2003), die offensichtlich durch NPY-unabhängige Mechanismen angetrieben wird.

4.1.1.2 Einfluss auf die POMC Expression

Zwischen der Expression des anorexigenen POMC im ARC und dem Körperfettgehalt bzw. der Plasmaleptinkonzentration der jüngeren Mäuse wurde eine positive Korrelation nachgewiesen (Abb. 3). POMC Neurone im ARC gelten ebenfalls als ein direktes Ziel von Leptin. Eine Koexpression von LepR-Rb und POMC wurde in Neuronen des ARC nachgewiesen (Cheung *et al.*, 1997). In elektrophysiologischen *in vitro* Versuchen löste Leptin eine Depolarisation von POMC Neuronen aus und aktivierte dadurch die POMC Expression auf direktem Weg (Cowley *et al.*, 2001). Zusätzlich vermindert Leptin den Stimulus von γ -Amino-Buttersäure (GABA), einem inhibitorischen Neurotransmitter, auf die POMC Neurone, die dadurch ein stärker depolarisierendes Potential annehmen können (Cowley *et al.*, 2001). Dhillon *et al.* (2001) zeigten eine dosisabhängige Beeinflussung der POMC Expression im Hypothalamus durch die zentrale Behandlung der Tiere mit einem rekombinanten Virus, das Leptin exprimiert. So wurde die POMC Expression nur durch hohe Dosen des Virus-Leptin angeregt und in diesem Zusammenhang eine reduzierte Futteraufnahme in weiblichen Ratten gezeigt.

Im Gegensatz zu dieser Aktivierung der POMC Neurone fand Sahu (1998) ein Absinken der POMC-mRNA Spiegel im ARC von *ad libitum* gefütterten Ratten nach *intra-cerebroventrikulärer* (icv) Gabe von Leptin. Ratten desselben Versuchprotokolls, die die gleiche Futterration erhielten wie die Leptin-behandelten Ratten, zeigten keine Änderung der POMC Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Einerseits könnte das von Sahu gezeigte Absinken der POMC Expression bei Ratten nach Leptinapplikation dadurch zustande gekommen sein, dass nach einem initialen Anstieg der POMC Expression mit Absinken der Nahrungsaufnahme und Verlust von Fettmasse bereits eine Gegenregulation eingesetzt hat. Des Weiteren muss eine *icv* Applikation von Leptin kritisch betrachtet werden. Die physiologische Konzentration an Leptin im Liquor (CSF) liegt weit unter der Dissoziationskonstante des Leptinrezeptors ($KD = 0,7 \text{ nM}$), eine Ausbildung des Leptin-Leptinrezeptor-Komplexes kann deshalb unter physiologischen Umständen nicht stattfinden (Tartaglia *et al.*, 1995; Ahima & Flier, 2000). Zusätzlich ist die LepR-Rb-Dichte entlang der Ventrikelwände gering im Vergleich zu der Rezeptordichte in dem Bereich des ARC, in dem die Zielneurone von Leptin durch die partiell durchlässige Blut-Hirn-Schranke leicht zu erreichen sind (Schwartz *et al.*, 1996b; Gross, 1992; Ahima & Flier, 2000). Die bei der *icv* Applikation über einen längeren Zeitraum unphysiologisch hohe Leptinkonzentration im Liquor könnte unter Umständen zu anderen Reaktionen führen als eine physiologische Erhöhung des Plasmaleptinspiegels.

Die POMC Expression ist im ARC von *ob/ob*-Mäusen reduziert, steigt jedoch deutlich an, wenn bei diesen Tieren Leptin substituiert wird (Thornton *et al.*, 1997). Futterentzug bedingt ebenfalls eine Suppression der POMC Expression im ARC, die durch eine Leptinapplikation verhindert werden kann (Kalra *et al.*, 1999). Die Zunahme der POMC Expression mit steigendem Körperfettgehalt und ansteigender Leptinkonzentration im Blut lässt auf einen Anstieg des anorexigen wirkenden α -Melanozyten stimulierenden Hormons (α -MSH) schließen (Weide *et al.*, 2003; Thornton *et al.*, 1997; Dhillon *et al.*, 2001). Trotz der widersprüchlichen Ergebnisse in der Studie von Sahu (1998) kann man insgesamt von einer stimulierenden Wirkung des Leptins auf die POMC Expression im ARC ausgehen. Mit steigendem Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinspiegel steigt die POMC Expression bei 35 und 56 Tage alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen an. Dadurch steigt vermutlich die Freisetzung von α -MSH und könnte auf diesem Wege bei Wildtypen die Futteraufnahme reduzieren, um einer Zunahme der Fettspeicher entgegenzuwirken. Trotz des kompletten Ausfalls des MC4R bei den $-/-$ Tieren und der dadurch verursachten Blockade der anorexigen vermittelten Antwort des POMC/ α -MSH über den MC4R, kann man jedoch davon ausgehen, dass α -MSH möglicherweise auch bei diesen Tieren eine gewisse anorektische Wirkung über den MC3R bewirken könnte (Pritchard *et al.*, 2002). Dennoch zeigen die 35-56 Tage alten $-/-$ Mäuse eine Hyperphagie (Weide *et al.*, 2003), die wie oben erläutert sogar trotz der niedrigen NPY Spiegel bei diesen jungen Tieren auftritt (Abb. 2). Die vorliegende Arbeit bestätigt somit überzeugend die ausschlaggebende Rolle des MC4R in der zentralen Regulation der Nahrungsaufnahme, die sich bereits in anderen Untersuchungen abzeichnete (Kesterson *et al.*, 1997; Kalra *et al.*, 1999; Huszar *et al.*, 1997).

Bei den jüngeren MC4R-defizienten Mäusen wird der Anstieg der POMC Expression zum Teil unmittelbar durch den Ausfall des MC4R bedingt: Nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes lässt sich bei 35 und 56 Tage alten Tieren ein signifikanter steigernder Effekt der MC4R Defizienz auf die POMC Expression nachweisen (Tab. V; Abb. 6B). Der Anstieg der POMC Expression mit zunehmendem Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinspiegel (Abb. 3) wird also durch den Einfluss des MC4R Defektes verstärkt, da der Gendosis-abhängige Anstieg der POMC Expression gleichsinnig zur positiven Korrelation zwischen dem anorexigenen Neuropeptid und den untersuchten systemischen Parametern wirkt.

Ein Defekt des MC4R führt, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, unabhängig vom Körperfettgehalt zu einem signifikanten Anstieg der POMC Expression bei den jüngeren Tieren (Tab. V; Abb. 6B). Diese Ergebnisse werden durch Studien bestätigt, in der eine Erhöhung der

POMC Expression bei Ratten mit chronischer Blockade des MC4R-Systems gefunden wurde (MacIntyre & Glueck, 2003); es liegen jedoch weder Angaben über das Alter dieser Tiere noch über die Länge der Behandlung vor. Durch den Anstieg der POMC Expression bei vorliegendem MC4R-Defekt könnte der Organismus versuchen, die Konzentration des MC4R Agonisten α -MSH zu erhöhen, um das Fehlen der anorexigenen Antwort aufgrund des Defekts im Melanokortinsystem zu kompensieren. Huszar *et al.* (1997) fanden zwar keinen Unterschied in der POMC Expression im ARC von -/- Mäusen im Vergleich zu Wildtypen, diese Tiere waren jedoch deutlich älter (ca. 6 Monate) als die jüngeren Tiere dieser Studie. Auch in der vorliegenden Arbeit ergaben sich zwischen den Werten von 9 Monate alten +/+ und -/- Tieren keine deutlichen Unterschiede in der POMC Expression (Abb. 15B). Nach Herauspartialisieren des erhöhten Körperfettgehaltes der -/- Tiere in der ANCOVA waren die Werte dieser Tiere sogar erniedrigt (Abb. 16B). Leider wurde in der Studie von Huszar *et al.* der Einfluss des Körperfettgehaltes auf die POMC Expression der -/- Tiere nicht berücksichtigt, so dass sich keine Aussage bezüglich der POMC Expression der 6 Monate alten -/- Tiere nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes machen lässt.

4.1.1.3 Einfluss auf die AGRP Expression

In der vorliegenden Arbeit konnte ein hemmender Effekt eines hohen Körperfettgehaltes bzw. der Plasmaleptinkonzentration auf die AGRP Expression im ARC bei jüngeren Wildtypen und MC4R-defizienten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 4). Mit steigendem Körperfettgehalt sinkt die AGRP-mRNA Konzentration im Hypothalamus der jüngeren Mäuse ab, die untersuchten Parameter sind signifikant negativ miteinander korreliert. Es ist bekannt, dass die Expression des orexigenen Neuropeptids AGRP, das in 98% der NPY Neurone im ARC koexprimiert wird (Broberger *et al.*, 1998; Shutter *et al.*, 1997), ebenfalls durch den Plasmaleptinspiegel der Tiere beeinflusst wird. Eine Koexpression von AGRP und LepR-Rb konnte nachgewiesen werden (Wilson *et al.*, 1999; Elmquist *et al.*, 1998). Zentrale Leptininjektionen vermindern die AGRP Expression, ein kurzfristiger Futterentzug führt zu einem Anstieg von AGRP-mRNA im ARC (Friedman & Halaas, 1998; Mizuno & Mobbs, 1999). Erhöhte AGRP-mRNA Spiegel in Leptin-defizienten Tieren lassen ebenfalls auf eine negative Regulation durch das Adipositassignal schließen, ein Anstieg der AGRP Expression als sekundärer Effekt einer Adipositas konnte aber durch Versuche an adipösen Tieren mit genetisch intaktem Leptinsystem ausgeschlossen werden (Wilson *et al.*, 1999).

AGRP wirkt als natürlicher Antagonist des α -MSH am MC4R und MC3R (Kalra *et al.*, 1999). *Yellow-Agouti* (A^y) Mäuse, ein genetisch adipöses Mausmodell, bei dem das Melanokortinsystem blockiert ist, zeigen eine Resistenz gegen zentral oder peripher verabreichtes Leptin und dementsprechend keine Veränderung ihrer AGRP Expression im Hypothalamus (Wilson *et al.*, 1999; Halaas *et al.*, 1997). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Tendenz, dass die jüngeren Tiere mit steigendem Körperfettgehalt der exzessiven Fettdeposition durch eine Erniedrigung der NPY Expression entgegen wirken, könnte möglicherweise durch die Suppression von AGRP unterstützt werden, das als orexigener Antagonist des ebenfalls angestiegenen α -MSH wirkt. Allerdings müsste man hier wiederum postulieren, dass statt des partiell bzw. komplett ausgefallenen MC4R auch der MC3R eine Wirkung des AGRP vermittelt.

Nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes bzw. der Plasmaleptinkonzentration mit Hilfe der ANCOVA lässt sich bei AGRP eine signifikante Abnahme der Expression mit der Anzahl der defekten Allele bei den jüngeren Tieren nachweisen (Tab. V; Abb. 6C). Die negative Beziehung zwischen der AGRP Expression und dem Körperfettgehalt wird somit durch den Einfluss des MC4R Defektes verstärkt. Die AGRP Expression bei den jüngeren MC4R-defizienten Tieren ist also noch niedriger als auf Grund ihres erhöhten Körperfettgehaltes zu erwarten wäre. Der MC4R Defekt wirkt sich demnach auf die AGRP Expression primär in entgegengesetzter Richtung aus als auf das koexprimierte NPY, dessen Expression bei den jüngeren $-/-$ Tieren relativ zum Körperfettgehalt überhöht ist (Abb. 16A; 4.1.1.1). Dadurch wird die Koexpression dieser beiden orexigenen Neuropeptide zwar lockerer, sie bleibt aber dennoch signifikant (Abb. 17). Partielle Abweichungen in der Beziehung zwischen koexprimierten Neuropeptiden konnten auch in anderen Tiermodellen nachgewiesen werden, worauf im Kapitel 4.1.5 näher eingegangen wird.

4.1.1.4 Einfluss auf die CART Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde eine positive Beziehung zwischen der CART Expression und dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel bei den jüngeren Tieren beobachtet, die jedoch nicht signifikant war (Abb. 5). Das anorexigen wirkende CART wird in Neuronen des ARC mit POMC und LepR-Rb koexprimiert und zählt ebenfalls zu den Vermittlern der Leptinwirkung (Vrang *et al.*, 1999; Elias *et al.*, 1998). Eine zentrale Leptinapplikation erhöht die CART-mRNA Konzentration im ARC (Kristensen *et al.*, 1998). Die Expression von CART ist, ebenso wie die POMC Expression, in *ob/ob*-Mäusen und in fastenden Ratten reduziert (Ahima *et al.*, 2000). Diese, in der Literatur beschriebene Stimulation der CART Expression durch Leptin

lässt sich jedoch in der vorliegenden Arbeit aufgrund der fehlenden Signifikanz der Korrelationen nicht stützen. Im Vergleich zur Expression der orexigenen Neuropeptide und von POMC scheint der Einfluss der untersuchten systemischen Parameter auf die CART Expression nur schwach.

Die nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes bei den jüngeren Tieren gefundene signifikante Erhöhung der CART Expression (Tab. V; Abb. 6C) durch die MC4R Defizienz verstärkt die Zunahme des anorektischen Signals mit steigendem Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinspiegel. Die Ursache für den primären Genotypeffekt auf die CART Expression der jüngeren Tiere ist unbekannt. Möglicherweise kommt es zu einer Interaktion zwischen CART und dem MC4R, die jedoch bis heute nicht nachgewiesen wurde. Des Weiteren könnte die Koexpression von POMC und CART den primären Genotypeffekt auf die CART Expression erklären.

4.1.2 Wie interagieren die untersuchten systemischen Parameter, das Alter und eine MC4R Defizienz hinsichtlich der Neuropeptidexpression im ARC?

Aufgrund der Tatsache, dass sich eine altersabhängige Leptin- bzw. Insulinresistenz gegen Ende der reproduktiven Phase entwickelt (Li *et al.*, 1998a; Scarpace *et al.*, 2002), ist es von großer Bedeutung, entstehende Veränderungen in diesem Alter zu analysieren, zumal auch beim Menschen in diesem Lebensabschnitt ein zunehmendes Risiko einer Adipositas besteht. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Tiere untersucht, die eine Zeitspanne vom frühen Jugendalter bis zum Ende der fertilen Periode abdeckten. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Einfluss des Körperfettgehaltes entscheidend auf die Neuropeptidexpression im ARC von jüngeren Tieren auswirkt (Abb. 2-5; 15; 4.1.1). Hingegen fand sich bei den 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Tieren keine signifikante Korrelation zwischen den untersuchten Neuropeptiden im ARC und dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel. Während die Wildtypen und ein Teil der heterozygoten MC4R-defizienten Mäuse einen ähnlichen Körperfettanteil wie die jüngeren Tiere aufweisen, hat die Mehrzahl der MC4R-defizienten 9 Monate alten Tiere einen höheren Körperfettgehalt und höhere Plasmaleptinspiegel als die jüngere Altersgruppe (siehe Abb. 15 und Kapitel 3.3.1). Der starke Einfluss des Körperfettgehaltes auf die Neuropeptidexpression im ARC, der bei 35 und 56 Tage alten Tieren nachgewiesen wurde, scheint bei den 9 Monate alten Mäusen also eine wesentlich geringere Rolle zu spielen als bei den jüngeren Tieren. Die zentrale Gegenregulation in Reaktion auf eine übermäßige Fettdeposition scheint zu versagen. Eine sich entwickelnde Leptinresistenz

mit -bei den -/- Tieren exzessiv- steigendem Körperfettgehalt könnte bei den MC4R-defizienten Mäusen erklären, warum sich die NPY Expression im ARC zunehmend der negativen Rückkopplung durch das lipostatische Hormon entzieht. Bei den Wildtypen könnte sich eine solche Leptinresistenz durch das zunehmende Alter entwickeln, wobei unklar ist, ob der auch bei den Wildtypen mit dem Alter zunehmende Körperfettgehalt als deren Ursache oder Folge zu betrachten ist.

Allerdings muss man bedenken, dass die fehlende Korrelation zwischen der Neuropeptidexpression und den untersuchten systemischen Parametern durch eine relativ geringe N-Zahl und die große Streuung bei den 9 Monate alten Tieren bedingt sein könnte. Zumindest lässt die visuelle Kontrolle der Beziehung zwischen der NPY- bzw. CART Expression und dem Körperfettgehalt vermuten, dass sich bei entsprechend höherer N-Zahl eine signifikante negative bzw. positive Korrelation zwischen der Neuropeptidexpression und den untersuchten systemischen Parametern bei den 9 Monate alten Tieren ergeben könnte (Abb. 15A, D). Für die Neuropeptidexpression von AGRP und POMC ist im Gegensatz zu den jüngeren Tieren keine Tendenz einer Veränderung mit dem Körperfettgehalt mehr erkennbar (Abb. 15B, C).

Bei den 9 Monate alten Mäusen lässt sich nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes kein Genotypeneffekt auf die NPY-, POMC- und CART Expression, jedoch auf die AGRP Expression nachweisen (nicht dargestellt). Bei der gemeinsamen Betrachtung der jüngeren und älteren Tiere konnte ein primärer Einfluss des Genotyps nur auf die CART Expression nachgewiesen werden (Tab. IX). Jedoch ergab sich für die POMC- und AGRP Expression eine signifikante Interaktion zwischen Alter und Genotyp (Tab. IX). Der fehlende Genotypeneffekt auf die POMC- und AGRP Expression lässt sich durch die gegenläufige Expression bei den beiden Altersstufen erklären (Abb. 16B, C).

Bei der gemeinsamen Betrachtung der 1-2 und 9 Monate alten Mäuse konnte ein signifikanter Einfluss des Alters nachgewiesen werden (Abb. 15, 16). Die NPY Expression der 9 Monate alten +/- und -/- Mäuse ist signifikant höher als bei den jüngeren Tieren, diese Tendenz lässt sich auch schon bei den Wildtypen erkennen (Abb. 16A). Zusätzlich kommt es bei den älteren Tieren zu einem Absinken der POMC Expression, die besonders bei den -/- Mäusen drastisch abfällt (Abb. 16B). Dies könnte darauf beruhen, dass die POMC Neurone bei den 9 Monate alten Tieren erschöpft sein könnten. Bis jetzt ist allerdings unklar, ob das Absinken der POMC Expression als alleiniger Effekt des Alters zu betrachten ist oder aber mit dem chronisch erhöhten

Körperfettgehalt der -/- Tiere zusammenhängt. Die AGRP Expression ist im Gegensatz zu den 35 und 56 Tage alten Mäusen bei den 9 Monate alten +/- und -/- Tieren am höchsten, während bei den Wildtypen die jüngeren Tiere die größte Menge an AGRP exprimieren (Abb. 16C). CART wird als einziges der untersuchten Neuropeptide in beiden Altersstufen in ähnlicher Menge exprimiert und scheint daher altersunabhängig vom Genotyp beeinflusst zu sein (Tab. IX).

In der vorliegenden Arbeit wurden regulierende Einflüsse des Körperfettgehaltes und einer MC4R Defizienz in der Zeitspanne kurz nach dem Absetzen bis zum Ende der fertilen Periode untersucht. Während dieser Periode steigt der Körperfettgehalt normaler Tiere mit zunehmendem Alter an, erst später nimmt er in der Seneszenz ab. Dieser zweiphasige Verlauf des Körperfettgehaltes im Zusammenhang mit dem Alter wurde in Studien, die Tiere vom frühen Erwachsenenalter bis ins hohe Alter untersuchten, bis jetzt noch nicht gesondert betrachtet. Aus diesem Grund ist es schwer, die teilweise gegensätzlichen Ergebnisse bezüglich altersabhängiger Änderungen in der Neuropeptidexpression im Hypothalamus zu beurteilen und mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit zu vergleichen (Gayle *et al.*, 1999; Gruenewald *et al.*, 1996; Kaneda *et al.*, 2001; Kowalski *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1998a; Morley, 2001). Die Interpretation altersbedingter Veränderungen der Neuropeptidexpression wird zusätzlich durch die Möglichkeit einer entstehenden Leptinresistenz mit zunehmendem Alter erschwert, vor allem dann, wenn die Tiere eine Adipositas entwickeln (Li *et al.*, 1998; Scarpace *et al.*, 2002).

Studien an Tieren, die noch in einem Alter sind, in dem sie auf Leptin reagieren und dementsprechend in der Lage sind, ihren Körperfettgehalt über eine negativ rückgekoppelte Antwort zu kontrollieren, zeigen, dass NPY-mRNA Spiegel in 9 Wochen alten weiblichen Mäusen niedriger sind als in 6 Wochen alten, sexuell noch unreifen Tieren (Chua *et al.*, 1991). Diese Studien bestätigen die Hypothese, dass ein ansteigender Körperfettgehalt die NPY Expression hemmt. Frühere Untersuchungen an bis zu 40 Wochen alten, genetisch adipösen Mäusen (Rizk *et al.*, 1998) und Ratten (Jhanwar-Uniyal & Chua, 1993) unterschieden nicht zwischen primären Einflüssen des Genotyps und sekundären Effekten der Körperfettgehaltes, wenn Änderungen der NPY Expression im Hypothalamus mit zunehmendem Alter beobachtet wurden. Zusätzlich wurde die Analyse der Neuropeptidexpression im gesamten Hypothalamus und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, in bestimmten Kerngebieten durchgeführt. Die Information über die Neuropeptidexpression in isolierten Kerngebieten wird jedoch benötigt, um eine Beziehung zwischen Ursache und Wirkung, die einer komplexen altersabhängigen Dynamik unterliegen, deutlich zu machen.

Zusammenfassend erscheinen die Änderungen in der Neuropeptidexpression mit zunehmendem Alter dadurch bedingt, dass eine MC4R Defizienz den Regelkreis innerhalb des zentralen peptidergen Signalwegs, der seinen Ursprung im ARC hat, fortschreitend verändert. Diese Veränderung schließt möglicherweise auch eine abweichende Beziehung zwischen koexprimierten Peptiden ein (siehe 4.1.1 und 4.1.5). Die daraus resultierende regulatorische Störung ist durch eine zunehmende Unfähigkeit charakterisiert, auf Veränderungen des Körperfettgehaltes im Sinne einer negativen Rückkopplung zu antworten.

4.1.3 Gibt es einen Einfluss des Insulinspiegels auf die Neuropeptidexpression im ARC?

Das Verhältnis zwischen der Neuropeptidexpression im ARC und dem Plasmainsulinspiegel wurde in der vorliegenden Arbeit bei 35 und 56 Tage alten, sowie 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen untersucht. Es entspricht im wesentlichen den Ergebnissen, die bei der Korrelation mit Körperfettgehalt oder dem Plasmaleptinspiegel gefunden wurden: Während bei den jüngeren Tieren eine signifikante Korrelation zwischen Neuropeptidexpression und Plasmainsulinkonzentration nachgewiesen wurde, konnte bei den 9 Monate alten Mäusen kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern gezeigt werden (nicht dargestellt).

Insulin kommt in verschiedenen Regionen des Gehirns von Säugetieren vor und wirkt über neuronale Insulinrezeptoren, die in großer Dichte im ARC exprimiert werden. Insulin induziert im Gehirn unter anderem kurz- und langzeitige Effekte in der Kontrolle von Futteraufnahme und Körpergewicht (Air *et al.*, 2002; Gerozissis, 2002). Neben einer direkten anorexigenen Wirkung beeinflusst Insulin die Nahrungsaufnahme auch durch kognitive Prozesse im Gehirn, die bei der Nahrungsaufnahme eine Rolle spielen (Woods *et al.*, 2000; Gerozissis, 2002).

Der anorexigene Effekt von Insulin im Gehirn schließt eine Interaktion mit den hypothalamischen Neuropeptiden ein. Insulin senkt die NPY Expression im ARC und damit die Futteraufnahme (Baskin *et al.*, 1999b). Sahu *et al.* (1995) zeigten eine suppressive Wirkung von peripher verabreichtem Insulin auf die NPY Freisetzung im PVN von fastenden Ratten. Ad libitum gefütterte Ratten aus demselben Versuchsprotokoll zeigten keine Veränderung der NPY Freisetzung im PVN. Pritchard *et al.* (2002) vermuten einen direkten Einfluss von Insulin auf die POMC Expression im Hypothalamus. Eine Insulinapplikation führte bei Ratten zu einem Anstieg der POMC-mRNA Spiegel im ARC (Kim *et al.*, 1999). Ein direkter Einfluss von Insulin auf die

AGRP- oder CART Expression im ARC wurde bis jetzt nicht beschrieben, Studien lassen jedoch vermuten, dass Insulin diese Neuropeptide auf eine ähnliche Weise wie Leptin beeinflusst (Schwartz *et al.*, 2000; Baskin *et al.*, 1999b). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Plasmainsulinkonzentration und der Neuropeptidexpression im ARC kann auch in der vorliegenden Arbeit nicht abgeleitet werden, da die Plasmaleptinkonzentration, als wesentliche Einflussgröße für die Neuropeptidexpression (siehe 4.1.1), signifikant mit dem Plasma-insulinspiegel korreliert ist (Abb. 14).

4.1.4 Interaktion der untersuchten Neuropeptide

Das Verständnis der hochkomplexen zentralen Regulationsmechanismen schließt eine mögliche Interaktion zwischen den untersuchten Neuropeptiden ein. Da in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Interaktion zwischen den Neuropeptiden nicht untersucht wurde, mussten vorangegangene Studien herangezogen werden, um die Beziehungen zwischen den Neuropeptiden zu betrachten. Am Ende des Kapitels wird versucht, die besprochenen Zusammenhänge zwischen den Neuropeptiden auf die Ergebnisse der Neuropeptidexpression in der vorliegenden Arbeit zu übertragen. Allerdings betrachten fast alle vorhergehenden Untersuchungen nur den Einfluss der NPY Neurone auf die übrigen untersuchten Neuropeptide ohne eine potentielle Rückwirkung der anderen Neuropeptide untereinander oder auf NPY zu diskutieren. Bei den hier untersuchten MC4R-defizienten Mäusen ist jedoch davon auszugehen, dass der Ausfall der MC4R primär zu einer erhöhten Expression von POMC als Vorstufe des MC4R-Liganden im ARC führt (4.1.1.2). Da über einen möglichen Einfluss von POMC Neuronen bzw. erhöhtem α -MSH Spiegel auf die NPY Expression jedoch keine Befunde vorliegen, wird die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse erschwert.

Autoregulation der NPY/AGRP Neurone. Im ARC findet sich der größte Anteil an NPY-exprimierenden Neuronen im Hypothalamus, von denen über 90% ebenfalls AGRP exprimieren (Broberger *et al.*, 1998). Diese Neurone aus dem ARC projizieren unter anderem in den lateralen Hypothalamus (LH), den paraventriculären Nukleus (PVN) und den dorsomedialen Nukleus (DMN) des Hypothalamus, wobei die Projektionen in den PVN besonders stark sind (Bai *et al.*, 1985; Smith, 1993). Zusätzlich finden sich jedoch auch kurze Projektionen in den ARC selbst (Meister, 2000), die möglicherweise durch die lokale Freisetzung von NPY im ARC die Aktivität spezifischer Neurone wie die NPY Neurone selbst oder POMC-exprimierende Zellen beeinflussen. NPY könnte die NPY/AGRP Neurone über hemmende Autorezeptoren

(NPY Rezeptorsubtypen Y_2 und Y_4) regulieren. Eine Aktivierung dieser Autorezeptoren verhindert auf diesem Wege eventuell die Freisetzung von NPY in den ARC Neuronen und eine Projektion zum PVN, LH oder in andere Gebiete (Williams *et al.*, 2001). In *in vitro* Versuchen wurde die Freisetzung von NPY aus dem Hypothalamus durch eine Aktivierung von Y_2 und Y_4 gehemmt (Williams *et al.*, 2001; King *et al.*, 1999).

Beeinflussung der POMC Expression und α -MSH Freisetzung durch NPY. Studien an Ratten zeigten eine weitere Verbindung zwischen NPY und POMC Neuronen auf. Broberger *et al.* (1997) wiesen die Expression des NPY Rezeptors Y_1 in der Mehrzahl der ARC-POMC Neurone nach. Der Y_1 zählt zu den postsynaptischen NPY Rezeptoren, der für die Weiterleitung der NPY Effekte auf die Futteraufnahme verantwortlich zu sein scheint (Flood & Morley, 1989; O'Shea *et al.*, 1997). Eine Aktivierung des Y_1 durch NPY hemmt die Ausschüttung des *second messengers* cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP) und unterdrückt damit die Aktivierung der POMC Neuronen (Herzog *et al.*, 1992; Broberger *et al.*, 1997). Die Expression von POMC wird also anscheinend auch auf diesem Wege über axonale Verbindungen von NPY Neuronen gehemmt, wobei diese NPY Axone wiederum über den Autorezeptor Y_2 reguliert werden können (Broberger *et al.*, 1997). Andererseits verminderte eine dosisabhängige Injektion von endogenem α -MSH den orexigenen Effekt einer NPY-induzierten Futteraufnahme (Hansen & Morris, 2002). Ergänzend zu dem direkten Einfluss auf die POMC Expression hemmt eine exogene NPY Gabe zusätzlich die Ausschüttung von α -MSH (Jegou *et al.*, 1993). NPY Infusionen ins Gehirn reduzierten die POMC-mRNA Konzentration und den α -MSH-Peptidgehalt im Hypothalamus männlicher Ratten (Blasquez *et al.*, 1995; Garcia De Yebenes *et al.*, 1995; Hansen & Morris 2002). Die Zugabe von NPY zu hypothalamischen Explantaten männlicher Ratten bewirkte hingegen einen Anstieg der α -MSH Freisetzung (Dhillon *et al.*, 2002).

Beeinflussung der POMC Expression durch NPY Neurone über GABA. Ungefähr ein Drittel aller NPY Neurone im ARC produzieren zusätzlich GABA. Über eine synaptische Verknüpfung dieser NPY/GABA Zellen mit POMC Neuronen (Csiffary *et al.*, 1990) reduziert GABA die Aktivität der POMC Neurone. Leptin bedingt eine Hyperpolarisation der NPY/GABA Neurone (Glaum *et al.*, 1996; Spanswick *et al.*, 1997; siehe 4.1.1), wodurch die inhibitorische Wirkung von GABA auf die Aktivität der POMC Neurone reduziert ist. Daneben kommt es durch die Autohemmung der NPY Ausschüttung über Y_2 Rezeptoren in den NPY/GABA Neuronen zu einer indirekten Aktivierung der POMC Neurone (Cowley *et al.*, 2001).

Beeinflussung der POMC Expression durch NPY/GABA über den MC3R. Der in POMC Neuronen exprimierte MC3R könnte ebenfalls eine Rolle bei der Interaktion zwischen den NPY/GABA- und den POMC Neuronen spielen. Der hochselektive MC3R Agonist D -Trp⁸- γ MSH erhöht die Freisetzung von GABA in POMC Neuronen (Grieco *et al.*, 2000). Zusätzlich führt dieser MC3R Agonist zu einer Hyperpolarisation der POMC Neurone und senkt die Zahl der Aktionspotentiale in den Zellen. Der MC3R könnte also die POMC Expression bei einem erhöhten Gehalt an POMC Peptiden autoregulatorisch senken (Cowley *et al.*, 2001; Cone *et al.*, 2001).

Beeinflussung der AGRP Expression durch NPY. Ein möglicher Einfluss von NPY auf die AGRP Expression wird diskutiert. Die pharmakologischen Wirkungsweisen von NPY (Aktivierung eines $G_{\text{inhibitorisch}}$ gekoppelten Rezeptors) und AGRP (Aktivierung eines $G_{\text{stimulatorisch}}$ gekoppelten Rezeptors) könnten die Wirkung der orexigenen Neuropeptide gegenseitig verstärken (Wilson *et al.*, 1999; Marsh *et al.*, 1999a). Zusätzlich zeigten *in vitro* Versuche an hypothalamischen Explantaten einen signifikanten Anstieg von AGRP-Immunoreaktivität durch NPY Gabe (Dhillon *et al.*, 2002). Da NPY und AGRP in fast allen Neuronen des ARC koexprimiert werden, kommt es bei Aktivierung dieser Neurone neben der orexigenen NPY-vermittelten Antwort auch zu einer kompetitiven Verdrängung des anorexigenen α -MSH am MC3R und MC4R durch AGRP (Fong *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1994; Ollmann *et al.*, 1997). Dadurch kann das orexigene Signal auf zwei Wegen im Hypothalamus verschaltet werden (Williams *et al.*, 2001).

Eine Verteilung des AGRP in nachgeschalteten Kerngebieten des Hypothalamus erfolgt über terminale NPY Fasern, die das AGRP aus den NPY/AGRP Neuronen in demselben synaptischen Komplex ausschütten, in dem auch α -MSH freigesetzt wird (Kalra *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2001). Eine zusätzliche Verteilung des AGRP erfolgt über AGRP Fasern selbst, die interessanterweise eine starke Überlappung mit POMC Fasern aufweisen.

Interaktion zwischen AGRP und POMC über MC3R und MC4R. Eine Co-Lokalisation des MC3R und MC4R mit AGRP und POMC Zellen wurde im ARC nachgewiesen (Bagnol *et al.*, 1999). Bei einem Vergleich von MCR-mRNA Verteilung und terminalen AGRP Projektionen konnte eine sehr deutliche Überlagerung der AGRP Endigungen und MC3R gezeigt werden (Mountjoy *et al.*, 1994; Roselli-Rehfuss *et al.*, 1993). Die Präsenz des MC3R sowohl in AGRP als auch in POMC Neuronen könnte eine Interaktion zwischen diesen beiden Neuropeptiden vermitteln. Die Aktivierung des MC3R durch Melanokortine erhöht die cAMP-Spiegel, eine

Blockade durch AGRP wirkt dementsprechend inhibitorisch auf die Zelle. Der MC3R könnte also über folgende Mechanismen die AGRP/POMC Interaktion beeinflussen: Die Expression des MC3R in POMC Neuronen dient möglicherweise der Verstärkung des AGRP Signals, da eine Blockade des MC3R durch AGRP die POMC Neurone hemmen und dadurch den postsynaptischen Effekt von AGRP verstärken könnte. Die Expression des MC3R in AGRP Neuronen bedeutet vielleicht zusätzlich eine negative Autoregulation des POMC Systems, da eine Aktivierung der AGRP Neurone durch POMC über den MC3R die postsynaptischen Effekte von POMC einschränken (Bagnol *et al.*, 1999). Beide möglichen Wirkungsmechanismen des MC3R würden zu einer Verstärkung des orexigenen Signals und zu einer Unterdrückung der anorexigenen Antwort im Hypothalamus führen und könnten den verlängerten Wirkungseffekt von AGRP nach *icv* Injektionen erklären (Rossi *et al.*, 1998).

Beeinflussung der CART Expression durch NPY. Terminale NPY Enden wurden in der Nähe von CART Neuronen im ARC selbst, aber auch im DMN und LH nachgewiesen (Lambert *et al.*, 1998; Broberger, 1999) und deckten einen Zusammenhang zwischen NPY und CART Peptiden auf. Eine zentrale Injektion von CART Peptiden kann die Stimulation der Futteraufnahme, ausgelöst durch eine *icv* NPY Injektion, verhindern (Lambert *et al.*, 1998; Broberger, 1999). Das deutet darauf hin, dass der Effekt der CART Peptide "down-stream" von NPY liegt und möglicherweise über Y₁ gehemmt werden könnte (Broberger, 1999; Kalra *et al.*, 1999). *In vitro* Versuche an hypothalamischen Explantaten führten allerdings zu einem Anstieg der CART Immunoreaktivität nach NPY Gabe und umgekehrt führte eine CART Applikation zu einem Anstieg der NPY Immunoreaktivität in den Explantaten (Dhillon *et al.*, 2002).

Berücksichtigung der Koexpression der Neuropeptide. Unter Berücksichtigung der Koexpression von NPY und AGRP bzw. POMC und CART kann man davon ausgehen, dass ein Einfluss von NPY nicht nur POMC, sondern auch CART betrifft bzw. eine Einwirkung von POMC auf AGRP auf diesem Wege auch die NPY Expression beeinflusst (Bagnol *et al.*, 1999). Allerdings sollte dabei bedacht werden, dass eine mögliche Koexpression nicht immer einer strengen Korrelation folgt, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde und in Kapitel 4.1.5 näher besprochen wird (Dhillon *et al.*, 2000; 2001; Abb. 17).

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass es für jedes der vier betrachteten Neuropeptide verschiedene Neuronensubpopulationen im Hypothalamus gibt, in denen diese exprimiert werden und die unterschiedlichen Funktionen dienen. Die Expression in diesen Subpopulationen wird

zudem durch mehrere Signale beeinflusst (Broberger *et al.*, 1997; Kalra *et al.*, 1999). Dadurch wird der Mechanismus der Regulation der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus wesentlich effektiver aber auch komplexer.

Interessanterweise ergeben die oben besprochenen *in vitro* Ergebnisse von Dhillon *et al.* (2002) eine teilweise gegensätzliche Aussage im Vergleich zu den oben betrachteten *in vivo* Versuchen. Dementsprechend sind die Resultate der *in vitro* Versuche kritisch zu beurteilen. Darüber hinaus sollte beachtet werden, dass in der vorliegenden Arbeit nur Literatur verwendet wurde, in denen Mäuse oder Ratten *in vivo* untersucht wurden, die keinen genetischen Defekt aufwiesen, der einen Einfluss auf die Neuropeptidexpression hätte haben können. Dennoch sind die *in vivo* Ergebnisse eine Zusammenfassung aus Ergebnissen von Mäusen *und* von Ratten aus verschiedenen Versuchsaufbauten, da es in der Literatur bis heute keine Arbeit gibt, die eine mögliche Interaktion zwischen allen vier untersuchten Neuropeptiden an Wildtyp-Mäusen untersucht. Teilweise wurde, je nach Versuchsaufbau, auch der gesamte Hypothalamus statt isolierten Kerngebieten untersucht.

Interpretation der vorliegenden Befunde mit Hilfe der oben besprochenen Interaktionen zwischen den Neuropeptiden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, sinkt bei den 35 und 56 Tage alten Tieren die NPY Expression im ARC mit steigendem Körperfettgehalt (Abb. 2) bei allen drei Genotypen ab. Dies könnte durch eine Hyperpolarisation der NPY/AGRP Neurone mit steigendem Plasmaleptinspiegel bedingt sein (Glaum *et al.*, 1996; Spanswick *et al.*, 1997). Dementsprechend müsste man davon ausgehen, dass der oben besprochene hemmende Einfluss von NPY auf die NPY/AGRP Neurone über Y_2 und Y_4 (Williams *et al.*, 2001), aber auch auf die POMC Expression über Y_1 (Broberger *et al.*, 1997; Herzog *et al.*, 1992), GABA (Cowley *et al.*, 2001) und MC3R (Grieco *et al.*, 2000) abnimmt. Die Hemmung der α -MSH Freisetzung (Jegou *et al.*, 1993) und der CART Expression über Y_1 sollte also (Broberger, 1999; Kalra *et al.*, 1999) bei steigendem Körperfettgehalt ebenfalls schwächer werden. Dadurch könnte diese Interaktion mit zunehmendem Körperfettgehalt und damit abnehmenden NPY Spiegeln indirekt zu einem Anstieg der POMC und CART Expression führen und den direkten Einfluss des defekten Rezeptors auf die POMC Expression ergänzen. Die in der vorliegenden Arbeit bei den 35 und 56 Tage alten Mäuse für alle drei Genotypen gemeinsam gezeigten Beziehungen zwischen dem Körperfettgehalt und der NPY-, AGRP-, POMC- und CART Expression im ARC stehen im Einklang mit dieser These, die bisher für Wildtypen aufgestellt wurde. Allerdings sollte der

direkte Einfluss des Körperfettgehaltes bzw. des Plasmaleptinspiegels auf die Expression der untersuchten Neuropeptide (4.1.1; Abb. 2-5) nicht außer acht gelassen werden.

Dieses, aus den Literaturbefunden abgeleitete Interaktions-Modell gilt zunächst für die Wildtypen (Abb. 6). Auf die *-/-* Mäuse hingegen lässt sich dies nur eingeschränkt übertragen. So kann man den vom Körperfettgehalt unabhängigen Anstieg der POMC und CART Expression bei den jüngeren *-/-* Tieren (Abb. 6B, D) nicht durch ein Absinken der NPY Expression und einer damit verbundenen Enthemmung begründen, da die jüngeren *-/-* Mäuse nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes eine hohe NPY Expression aufweisen (Abb. 6A). Es ist jedoch davon auszugehen, dass die hohe POMC Expression bei den jüngeren *-/-* Tieren eine primäre Folge des Rezeptordefektes ist, da eine kompensatorische Erhöhung des Agonisten zu erwarten ist (Weide *et al.*, 2003; 4.1.1). Aus diesem Grunde stellt sich die Frage, ob nicht umgekehrt die erhöhte POMC Expression bzw. der erhöhte α -MSH Spiegel die NPY Expression stimulieren könnte (MacIntyre & Glueck, 2003). Da es in vorangegangenen Studien jedoch keine Befunde über einen direkten Einfluss der POMC Neurone auf die NPY Neurone gibt, bleibt die Antwort dieser Frage leider offen. Eine Übertragung des Interaktions-Modells auf die Ergebnisse der 9 Monate alten Tiere der vorliegenden Arbeit erscheint angesichts der zunehmend entgleisenden Neuropeptidexpression (4.1.2) und dem unvollständigen Wissen über die Interaktionen der verschiedenen Neuropeptide nicht sinnvoll.

4.1.5 Veränderungen in der Beziehung zwischen koexprimierten Neuropeptiden kommen auch in anderen Tiermodellen vor

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Koexpression von NPY und AGRP bzw. POMC und CART in Neuronen des ARC bestätigt werden (Broberger *et al.*, 1998; Shutter *et al.*, 1997; Vrang *et al.*, 1999; Elias *et al.*, 1998), jedoch weisen die individuellen Werte der untersuchten Neuropeptide eine deutliche Streuung auf (Abb. 17). Nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes bzw. des Plasmaleptinspiegels zeigte der Genotypeinfluss einen entgegengesetzten Effekt auf die Expression der koexprimierten Neuropeptide NPY und AGRP bei den jüngeren Mäusen. Während die *-/-*-Tiere den höchsten NPY-mRNA Gehalt im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen aufwiesen, hatten sie den niedrigsten AGRP-mRNA Spiegel im ARC (Abb. 16A, C).

Abweichungen im mRNA Gehalt koexprimierter Neuropeptide sind im Zusammenhang mit Störungen im Energiehaushalt in verschiedenen Tiermodellen beschrieben worden. In Sprague-Dawley und schlanken heterozygoten (+/*fa*) und adipösen homozygoten (*fa/fa*) Zuckerratten konnte gezeigt werden, dass sich das Verhältnis der NPY und AGRP Expression je nach Hungerzustand und Genotyp unterschied. Dies beruht vermutlich auf einer ungleichen Sensitivität der Neuropeptidexpression gegenüber Leptin oder anderen kontrollierenden Faktoren, wie z.B. Insulin (Korner *et al.*, 2001). Auch Dhillon *et al.* (2001) fanden Unterschiede in der Beeinflussung der Expression dieser orexigenen Neuropeptide im ARC bei weiblichen Ratten durch rekombinantes Virus-Leptin. Ungeachtet einer Suppression der NPY Expression durch dieses Virus-Leptin wurde keine reduzierte AGRP Expression nachgewiesen. Eventuell reichte die virusabhängige Leptinproduktion in der angewandten Dosis zwar zu einer „down-regulation“ der NPY Expression, ließ aber die AGRP Expression unbeeinflusst.

Auch POMC und CART werden in einigen Neuronengebieten im ARC wahrscheinlich nicht immer in gleicher Menge koexprimiert. Quantitative Unterschiede in ihrer Expression wurden als Antwort auf eine Leptinapplikation in *ob/ob* Mäusen gefunden (Dhillon *et al.*, 2000). Dementsprechend sind Unterschiede zwischen koexprimierten Neuropeptiden nicht ungewöhnlich, obwohl die Faktoren, die solche Änderungen kontrollieren oder verursachen, nicht bekannt sind. Die hochkomplexen Interaktionen zwischen den Neuropeptiden (Hansen & Morris, 2002; Cowley *et al.*, 2001; Broberger *et al.*, 1997; 4.1.4) und der Einfluss einer positiven Rückkopplung (Dhillon *et al.*, 2002) könnten diese Unterschiede in der Koexpression erklären. Unterschiedliche Empfindlichkeiten bezüglich der Neuropeptidexpression gegenüber MC4R Defizienz, Alter, Leptin, Insulin oder anderen spezifischen physiologischen Parametern, z.B. Fütterungsbedingungen (Korner *et al.*, 2001; Mizuno *et al.*, 1999) könnten ebenfalls einen Unterschied im Verhältnis der koexprimierten Neuropeptide in der vorliegenden Studie bedingen.

4.2 Analyse systemischer Parameter bei Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen

4.2.1 Einfluss des Genotyps auf die Körperzusammensetzung

In der vorliegenden Arbeit und in vorangegangenen Studien wurde ein Einfluss des Genotyps auf die Körperzusammensetzung von MC4R-defizienten Mäusen verschiedener Altersgruppen nachgewiesen.

Wie wirkt sich eine MC4R Defizienz auf die Körpermasse aus? Huszar *et al.* (1997) betrachteten in einer Verlaufsstudie die Gendosis-abhängige Zunahme der Körpermasse von männlichen und weiblichen MC4R-defizienten Mäusen in einem Alter von ca. 2 Wochen bis 8 Monaten. Weide *et al.* (2003) untersuchten die Körpermasse von Welpen bis zu einem Alter von 2 Monaten. Die Tiere beider Studien hatten denselben genetischen Hintergrund wie die Tiere in der vorliegenden Arbeit. Beide Untersuchungen zeigten, dass sich das Körpergewicht der $-/-$ Tiere in den ersten vier Lebenswochen nicht von dem der gleichaltrigen Wildtypen oder $+/-$ Mäuse unterschied. Ab einem Alter von einem Monat nahmen bei Huszar *et al.* die Mehrzahl der $-/-$ Männchen und Weibchen gegenüber den Wildtypen deutlich an Gewicht zu und mit 2 Monaten zeigten alle $-/-$ Tiere dieser Studie eine höhere Körpermasse als die Wildtypen. Bei Weide *et al.* wiesen die $-/-$ Tiere bereits in einem Alter von einem Monat signifikante Unterschiede im Körpergewicht gegenüber ihren $+/+$ und $+/-$ Wurfgeschwistern auf. In beiden Studien trat ein Heterozygotenunterschied ab einem Alter von 2 Monaten auf. Zu diesem Zeitpunkt hatten die $+/-$ Tiere bei Weide *et al.* eine 7% höhere Körpermasse, während gleichaltrige $-/-$ Mäuse eine bereits um 50% höhere Körpermasse zeigten. Huszar *et al.* fanden hingegen erst bei 4 Monate alten männlichen und weiblichen $-/-$ Mäusen eine um 50% höhere Körpermasse gegenüber den Wildtypen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Gendosis-abhängiger Einfluss auf die Körpermasse von 9 Monate alten Männchen und Weibchen nachgewiesen (Abb. 9; Tab. VI). Die 9 Monate alten $+/-$ Männchen und Weibchen zeigten eine ca. 25-30% höhere Körpermasse als die Wildtypen, die Differenz zwischen diesen beiden Genotypen war bei den 9 Monate alten Mäusen also nahezu 4-mal größer als bei den jüngeren Tieren. Während die $-/-$ Weibchen eine mehr als 100% höhere Körpermasse als die weiblichen $+/+$ Tiere aufwiesen, kam es bei den Männchen zu einer gleichmäßigen Gendosis-abhängigen Zunahme der Körpermasse, so dass die Differenz in der Körpermasse zwischen den $-/-$ Männchen und Wildtypen 50% betrug. Auf die

deutlich erhöhte Körpermasse der $-/-$ Weibchen wird bei der Betrachtung der geschlechtsbedingten Unterschiede näher eingegangen (siehe 4.2.2). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass sich der bei den jüngeren Tieren zuerst relativ schwache Unterschied in der Körpermasse von $+/-$ und $+/+$ Mäusen (Weide *et al.*, 2003; Huszar *et al.*, 1997) mit zunehmendem Alter verstärkt und es dadurch bei den 9 Monate alten Mäusen zu einem relativ gleichmäßig ansteigenden Gendosis-abhängigen Effekt auf die Körpermasse kommt.

Auch Chen *et al.* (2000) wiesen in einer Verlaufsstudie bei 1-5 Monate alten MC4R-defizienten Mäusen einer anderen Zuchtlinie einen altersabhängigen Unterschied im Dominanzgrad in Bezug auf die Körpermasse nach. So zeigten $-/-$ Männchen mit ca. 1 ½ Monaten etwas später als bei Weide *et al.* (2003) eine signifikant höhere Körpermasse als die männlichen Wildtypen. Ein Heterozygotenunterschied trat wie bei beiden oben besprochenen Studien bei 2 Monate alten Männchen auf, zu diesem Zeitpunkt zeigten die $-/-$ Männchen wie bei Weide *et al.* (2003) eine 50% höhere Körpermasse als die Wildtypen. Zusätzlich wurde von Chen *et al.* ein geschlechtsspezifischer Unterschied in Hinblick auf die Körperzusammensetzung nachgewiesen. Während sich die Zunahme der Körpermasse bei den $-/-$ Weibchen ähnlich wie bei den $-/-$ Männchen verhielt, konnte bei den $+/-$ Weibchen bis zu einem Alter von 5 Monaten -im Gegensatz zu dem nachgewiesenen Heterozygotenunterschied bei den Männchen- kein signifikanter Unterschied zu der Körpermasse der $+/+$ Weibchen festgestellt werden (Chen *et al.*, 2000). In Bezug auf den fehlenden Heterozygotenunterschied bei den Weibchen unterscheiden sich die Ergebnisse der genannten Studien von den Daten bei Huszar *et al.* (1997) und Weide *et al.* (2003) und auch von den Werten der 9 Monate alten Mäuse in der vorliegenden Arbeit.

Wie in vorangegangenen Studien (Huszar *et al.*, 1997; Weide *et al.*, 2003) wurden in der vorliegenden Arbeit nur Tiere eines Auszuchtstammes ohne Rückkreuzung auf den C57Bl6-Mäusestamm untersucht. Zwar besteht bei einem Auszuchtstamm die Möglichkeit, genetisch bedingte Unterschiede aufgrund des breiten genetischen Hintergrundes des Zuchtstammes zu übersehen. Ein wesentlicher Vorteil eines Auszuchtstammes besteht allerdings darin, dass man bei einem signifikant auftretenden Genotypunterschied davon ausgehen kann, dass dieser Genotypeffekt sich nicht nur auf einen bestimmten Inzuchtstamm bezieht und im Verhältnis zu einem heterogenen Hintergrund deutlich hervortritt. Das gezielte Ausschalten eines Gens sollte jedoch nur unter Einbeziehung von molekularen, neurobiologischen und verhaltensbedingten Hintergründen interpretiert werden (Gerlai, 1996; Gingrich & Hen, 2000). Die primären Einflüsse

einer MC4R Defizienz auf die Variabilität der Körpermasse sollten daher nur im Zusammenhang mit dem bei Weide *et al.* (2003) für die jüngeren Tiere nachgewiesenen Einfluss der Wurfgröße und anderen Aufzuchtbedingungen gedeutet werden.

Einfluss des MC4R Defektes auf Körperfettmasse und Körperfettgehalt. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien (Huszar *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000), in denen nur die Körpermasse analysiert wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu der Körpermasse wie bei Weide *et al.* (2003) für die jüngeren Tiere auch die Körperzusammensetzung der 9 Monate alten Tiere untersucht. Dabei wurde ein Gendosis-abhängiger Effekt auf die Körperfettmasse von 9 Monate alten Männchen und Weibchen nachgewiesen (Abb. 9; Tab. VI). Bei den Männchen kam es zu einem gleichmäßigen Gendosis-abhängigen Anstieg der Körperfettmasse wobei die -/- Männchen dieser Altersstufe eine mehr als 100% höhere Körperfettmasse als die Wildtypen zeigten. Bei den 9 Monate alten +/- Weibchen lag die Körperfettmasse bereits mehr als 100% über der der Wildtypen, die -/- Weibchen zeigten mit einer 7-mal höheren Körperfettmasse einen extremen Anstieg dieses Parameters gegenüber den +/- Weibchen. Auf diesen massiven Anstieg der Körperfettmasse bei den 9 Monate alten -/- Weibchen und die Unterschiede zwischen dem Effekt der MC4R Defizienz bei 9 Monate alten Männchen und Weibchen wird in dem Abschnitt 4.2.2 näher eingegangen. Weide *et al.* (2003) zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen der Körperfettmasse von -/- gegenüber +/- Mäusen erstmals mit 35 Tagen, ein signifikanter Heterozygotenunterschied ließ sich ab einem Alter von 56 Tagen nachweisen (Weide *et al.*, 2003). Die 56 Tage alten +/- Mäuse zeigten nur 20% mehr Körperfettmasse als die Wildtypen, die Körperfettmasse der -/- Tiere lag jedoch 3-mal höher als bei den Wildtypen. In der Originalstudie von Huszar *et al.* (1997), in der nur die Körpermasse betrachtet wurde, wurde eine spät einsetzende Adipositas bei den MC4R-defizienten Tieren postuliert. Weide *et al.* (2003) konnten jedoch durch die genaue Analyse der Körperzusammensetzung eine früh einsetzende exzessive Fettdeposition bei -/- Tieren in einem Alter zwischen 21 und 35 Tagen zeigen. Vergleicht man den Einfluss des MC4R Defektes bei den jüngeren Tieren mit den Effekten bei den 9 Monate alten Mäusen, so scheint es -ähnlich wie bei der Körpermasse- eine Änderung im Dominanzgrad der MC4R Defizienz zu geben: Bei älteren weiblichen Tieren scheint sich sowohl der Heterozygotenunterschied, als auch der Unterschied zwischen -/- und +/- Weibchen zu verstärken. Bei den 9 Monate alten Männchen wirkt sich der MC4R Defekt interessanterweise mit steigender Gendosis im Gegensatz zu den Unterschieden bei den jüngeren Tieren gleichmäßig aus.

Betrachtet man den Körperfettgehalt der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 9 Monate alten Mäuse, so wurde für die Weibchen ein gleichmäßiger Gendosis-abhängiger Anstieg nachgewiesen, wobei die $-/-$ Weibchen einen ca. 200% höheren Körperfettgehalt als die $+/+$ Weibchen zeigten (Abb. 9; Tab. VI). Auch bei den Männchen wiesen die Heterozygoten Werte auf, die ähnlich wie bei der Körperfettmasse zwischen denen der Wildtypen und den Homozygoten lagen, wenngleich sich die Werte der $-/-$ Männchen nicht signifikant von denen der $+/-$ Männchen unterschieden. Möglicherweise bedingen die relativ geringe N-Zahl der 9 Monate alten Männchen (Tab. III) und die hohe Streuung der Werte in dieser Altersstufe die fehlende Signifikanz des Unterschiedes zwischen den $+/-$ und $-/-$ Tieren. Der Unterschied im Körperfettgehalt bei den $+/-$ und $+/+$ Männchen war mit ca. 30% geringer als bei den Weibchen (siehe oben). Die altersabhängige Entwicklung des Körperfettgehaltes entsprach der der Körperfettmasse (Weide *et al.*, 2003). 56 Tage alte $-/-$ Mäuse wiesen einen doppelt so hohen Körperfettgehalt wie ihre $+/-$ Geschwister auf, während sich der Körperfettgehalt von $+/-$ Tieren weniger als 30% von dem der Wildtypen unterschied. Ähnlich wie bei der Körperfettmasse zeigte sich auch beim Körperfettgehalt ein schwächerer Dominanzgrad bei den jüngeren Tieren als bei den 9 Monate alten Weibchen, während der Dominanzgrad bei den 9 Monate alten Männchen schwächer zu werden scheint.

Einfluss der MC4R Defizienz auf die FFDM (fettfreie Trockenmasse). Die Analyse der FFDM in der vorliegenden Arbeit zeigte bei den 9 Monate alten Männchen einen Gendosis-abhängigen Effekt (Abb. 9; Tab. VI). Bei den gleichaltrigen Weibchen zeigten die $+/-$ Tiere zwar eine höhere FFDM als die $+/+$ Tiere, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Weide *et al.* (2003) wiesen erst ab einem Alter von 56 Tagen eine signifikant höhere FFDM bei den $-/-$ Tieren gegenüber ihren Wurfgeschwistern auf. Ein Heterozygoteneffekt trat bis zu einem Alter von 56 Tagen nicht auf.

In der Originalstudie von Huszar *et al.* (1997) wurde das Längenwachstum bei MC4R-defizienten Tieren im Alter von 4-5 Monaten untersucht. In diesem Alter waren sowohl männliche als auch weibliche $-/-$ Tiere signifikant länger als $+/-$ und $+/+$ Tiere gleichen Alters und auch die $+/-$ Männchen und Weibchen unterschieden sich in ihrer Körperlänge signifikant von den Wildtypen (Huszar *et al.*, 1997). Während die Körperlänge ein nur relativ ungenau zu bestimmender Parameter ist, erlaubt die Analyse der FFDM, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, exakte Angaben über die Größe der fettfreien Körpersubstanz. Der Effekt der

MC4R Defizienz auf die Körperlänge entspricht jedoch ungefähr den Befunden, die in der vorliegenden Arbeit für die FFDM erhoben wurden.

4.2.2 Einfluss des Geschlechts auf die Körperzusammensetzung

In der vorliegenden Arbeit traten deutliche Unterschiede in der Körperzusammensetzung von Männchen und Weibchen auf (Abb. 9; Tab. VI). Zudem ergab sich eine signifikante Interaktion zwischen dem Genotyp und dem Geschlecht der 9 Monate alten Mäuse für Körpermasse sowie Körperfettmasse bzw. Körperfettgehalt (Tab. VI). Bei den jüngeren Tieren dagegen trat bis zu einem Alter von 56 Tagen bei keinem der systemischen Parameter eine Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht auf (Weide *et al.*, 2003). In der Originalstudie gehen Huszar *et al.* (1997) nicht auf geschlechtsbedingte Unterschiede in der Körperzusammensetzung ein.

Wie unterscheidet sich die Körperzusammensetzung männlicher und weiblicher Wildtypen und Heterozygoten? In der vorliegenden Arbeit zeigten die 9 Monate alten männlichen Wildtypen in allen untersuchten Parametern der Körperzusammensetzung signifikant höhere Werte als die Weibchen (Abb. 9). Dieses Verhältnis zwischen den Werten von Männchen und Weibchen ändert sich auch bei heterozygotem MC4R-Defekt nicht; nur bezüglich des Körperfettgehaltes zeigen +/- Tiere beiderlei Geschlechts keinen signifikanten Unterschied mehr.

Geschlechtsbedingte Unterschiede in der Wirkung des MC4R Defektes bei -/- Tieren. Betrachtet man jedoch die Daten der 9 Monate alten -/- Mäuse, so ergab sich für die homozygoten Weibchen interessanterweise ein deutlich höherer Körperfettmasse und dadurch eine entsprechend höhere Körpermasse als für die männlichen -/- Tiere (Abb. 9). Die -/- Männchen hatten jedoch eine höhere FFDM als die -/- Weibchen. Der bei den 9 Monate alten weiblichen -/- Tieren im Vergleich zu den +/- Weibchen massive Anstieg der Körperfettmasse steht im Kontrast zu dem gleichmäßigen Anstieg dieses Parameters mit steigender Gendosis bei den Männchen. Der komplette Ausfall des MC4R scheint sich also bei den älteren Weibchen stärker auf die Körperfettmasse auszuwirken als bei den Männchen, während die Wirkung bei den jüngeren Tieren gleich ist.

Betrachtet man das Verhältnis zwischen Körperfettmasse und Feuchtmasse bei den Weibchen (Abb. 8A), erkennt man einen proportionalen Anstieg der beiden Parameter, wobei die weiblichen Tiere bei gleicher Feuchtmasse eine höhere Körperfettmasse als die Männchen aufweisen. Die Beziehung zwischen der Feuchtmasse und dem Körperfettgehalt der 9 Monate alten Weibchen beschreibt bis zu einem Körperfettgehalt von 50% ebenfalls einen proportionalen Anstieg (Abb. 8B), bei höheren Werten stellt sich die Beziehung zwischen diesen beiden Parametern aber als eine X-Achsen parallele Sättigung der Kurve dar. Fast alle -/- Weibchen weisen einen Wert um 60% Körperfett auf und erreichen damit den für ein Säugetier maximal möglichen Körperfettgehalt. Untersucht man den Wassergehalt der Weibchen in Bezug auf die Feuchtmasse, so verlaufen auch bei dieser Beziehung die Werte der meisten -/- Weibchen X-Achsen parallel (nicht dargestellt). Das Verhältnis der Komponenten der Körperzusammensetzung ändert sich also ab dem maximal erreichbaren Körperfettgehalt nicht mehr, die Anteile von Wassermasse, FFDM und Körperfettmasse nehmen in gleichem Verhältnis zur Feuchtmasse zu (Abb. 7; 8A).

4.2.3 Einfluss von Genotyp und Geschlecht auf die untersuchte Hormonkonzentration

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Plasmaleptinkonzentration bei 9 Monate alten Tieren proportional mit steigender Fettmasse zunimmt (Abb. 10A, C), während die Beziehung zum Körperfettgehalt eine exponentielle Zunahme zeigt (Abb. 10B, D) und sich erst in halb-logarithmischer Darstellung linear darstellt (Abb. 11). Bei jüngeren Tieren steigt die Plasmaleptinkonzentration bis zu einem Alter von 56 Tagen hingegen sowohl mit steigender Fettmasse als auch mit steigendem Körperfettgehalt proportional an (Weide *et al.*, 2003). Eine MC4R Defizienz scheint die Regulation der Plasmaleptinspiegel bei diesen jungen Tieren dem visuellen Eindruck nach nicht zu beeinflussen. Die enge gemeinsame Korrelation für die drei Genotypen, die bei den jüngeren Mäusen zwischen der Körperfettmasse und der Plasmaleptinkonzentration gefunden wurde, steht im Kontrast zu Ergebnissen bei Tieren, die einen genetischen Defekt des Leptinrezeptors aufweisen (Zhang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001). Die Defekte des Leptinrezeptors *db* und *fa* führen zu einem überproportionalen Anstieg der Plasmaleptinkonzentration mit ansteigendem Körperfettgehalt. Dieses Missverhältnis entsteht unter anderem durch einen Verlust der sympathisch regulierten negativen Rückkopplung der Leptinproduktion in den Adipozyten, welche normalerweise über eine Aktivierung der zentralen Leptinrezeptoren vermittelt wird (Zhang *et al.*, 2001).

Der Verlust der MC4R Funktion im Gehirn ist hingegen nicht mit einem Verlust der negativen Rückkopplung auf den Plasmaleptinspiegel verbunden. Aufgrund des asymptotischen Verlaufes des Körperfettgehaltes im Verhältnis zu der Feuchtmasse ergibt sich bei den 9 Monate alten Tieren in der vorliegenden Arbeit (Abb. 8B) eine lineare Beziehung zwischen dem Körperfettgehalt und der Plasmaleptinkonzentration erst in halblogarithmischer Darstellung (nicht dargestellt). Der in der vorliegenden Arbeit gefundene überproportionale Anstieg der Plasmaleptinkonzentration bei gleichem, extrem hohen Körperfettgehalt könnte durch eine mit zunehmendem Alter und/oder Körperfettgehalt auftretende Leptinresistenz verursacht werden. Dabei spielt sicherlich der Körperfettgehalt eine größere Rolle als das Alter, da bei allen 9 Monate alten Tieren in der vorliegenden Arbeit die überproportionale Zunahme des Plasmaleptinspiegels erst ab einem Körperfettgehalt über 40% auftritt. Diese Daten machen deutlich, dass der Körperfettgehalt nicht die direkt entscheidende Einflussgröße für die Kontrolle des Plasmaleptinspiegels ist, da ein weiterer Anstieg der Plasmaleptinkonzentration (Abb. 10B, D) bei konstantem, extrem hohen Körperfettgehalt (Abb. 8B) auftritt.

Die Faktoren, die für die Regulation des Plasmaleptinspiegels ausschlaggebend sein könnten, sind anhand von entsprechenden Befunden mehrfach diskutiert, aber nicht abschließend geklärt worden. Es gibt allerdings eindeutige Anzeichen dafür, dass der Plasmaleptinspiegel unabhängig von Veränderungen der Körperfettmasse auf metabolische Stimuli reagieren kann. Eine besondere Bedeutung kommt den Energiemetaboliten zu, wobei nicht nur die Menge, sondern auch die Richtung der Metaboliten- bzw. Energieströme eine Rolle spielt. Shintani *et al.* (2000) zeigten, dass freie Fettsäuren *in vitro* die Leptinproduktion in Rattenadipozyten erniedrigten. Außerdem ist bekannt, dass sich der Plasmaleptinspiegel kurzfristig mit dem Ernährungsstatus verändert. Fasten über 24 h führt ohne eine bedeutende Änderung der Körperfettmasse zu einem starken Abfall des Plasmaleptinspiegels (Trayhurn *et al.*, 1995). Bei *ad libitum* gefütterten Ratten erreicht der Plasmaleptinspiegel ca. 8 h nach Beginn der Nahrungsaufnahme sein Maximum, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Nährstoffe bereits absorbiert wurden und dem Körper zur Verfügung stehen (Saladin *et al.*, 1995). Wang *et al.* (1998) konnten zeigen, dass der Glukosestoffwechsel ebenfalls eine wichtige regulatorische Funktion auf den Plasmaleptinspiegel ausübt. Der Anstieg eines Stoffwechselproduktes des Glukoseabbaus (UDP-N-Acetylglucosamin) führt zu einem Anstieg der Leptinproduktion im Fettgewebe und im Skelettmuskel. Die Verfügbarkeit von Energie in der Zelle scheint also einen stimulierenden Einfluss auf die Plasmaleptinkonzentration zu haben. Neben einem autokrinen Feedback der Adipozyten (Zhang *et al.* 1997) spielt das sympathische Nervensystem eine wichtige Rolle für die Kontrolle des

Plasmaleptinspiegels. Über eine Rückkopplung des von zentralen Leptinrezeptoren erfassten Leptinsignals auf die Adipozyten beeinflusst das sympathische Nervensystem die Expression von Leptin und damit den Plasmaleptinspiegel wesentlich (Hufnagel, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Trayhurn *et al.*, 1995).

Ein Gesamteinfluss des Geschlechts auf den Plasmaleptinspiegel von 9 Monate alten Mäusen konnte nicht nachgewiesen werden (Tab. VII; VIII). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Plasmaleptinkonzentration nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes nur bei den weiblichen Tieren signifikant durch den Genotyp beeinflusst wird (Tab. VIII). Beim Menschen besitzen Frauen einen hohen Anteil an subkutanem Fettgewebe, während sich die Fettdepots bei Männern überwiegend viszeral verteilen. Der Plasmaleptinspiegel steht in enger Beziehung mit der Menge des subkutanen Fettgewebes, so dass die Plasmaleptinkonzentration besser mit dem Körperfettgehalt von Frauen als von Männern korreliert (Woods *et al.*, 2003). Es wurden zwar innerhalb des Fettgewebes von Mäusen, Ratten und Menschen regionale Unterschiede in der Leptin-mRNA Konzentration zwischen den einzelnen Fettdepots nachgewiesen (Trayhurn *et al.*, 1995; Rousseau *et al.*, 1997; Masuzaki *et al.*, 1995), diese Unterschiede bezogen sich aber nicht auf eine geschlechtsbedingte Verteilung der Fettdepots. Der in der vorliegenden Arbeit nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes gezeigte signifikante Einfluss der MC4R Defizienz auf den Plasmaleptinspiegel bei den 9 Monate alten Weibchen ließe sich jedoch nur dann durch einen geschlechtsbedingten höheren Anteil an subkutanem Fettgewebe erklären, wenn sich dieser subkutane Fettanteil bei den extrem adipösen -/- Weibchen trotz gleichbleibendem Gesamt-Körperfettgehalt erhöhte. Über eine solche selektive Zunahme der subkutanen Fettdepots bei extrem adipösen weiblichen Mäusen liegen jedoch zum jetzigen Zeitpunkt keine Studien vor.

Der Plasmainsulinspiegel zeigt bei den 9 Monate alten Weibchen und Männchen sowohl im Verhältnis zur Körpermasse als auch zum Körperfettgehalt eine exponentielle Zunahme (nicht dargestellt), in der halb-logarithmischen Darstellung ergibt sich für die Beziehung zwischen dem Hormon und dem Körperfett somit eine lineare Beziehung (Abb. 12). Nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes konnte kein Genotypeffekt auf die Plasmainsulinkonzentration nachgewiesen werden (Tab. VIII), der MC4R Defekt scheint also keine Störung in der Kontrolle des Plasmainsulinspiegels zu bewirken. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass die Plasmainsulinkonzentration von 9 Monate alten Männchen auch nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes höher ist als die der Weibchen (Abb. 13; Tab. VIII). Haffner (2000) vermutet einen Zusammenhang zwischen dem Plasmainsulinspiegel und steigenden

Testosteronwerten bzw. sinkenden „sex hormone binding globulin“ (SHBG) Werten in Menschen, da eine zunehmende Androgenisierung bei Frauen eng mit einem Anstieg des Plasmainsulinspiegels korreliert ist. Bei Männern vermutet Haffner eine umgekehrte Beziehung zwischen SHBG und der Plasmainsulinkonzentration. Andere Studien beschreiben den engen Zusammenhang zwischen der Plasmainsulinkonzentration und der Körperfettverteilung bei Menschen und Ratten (Woods *et al.*, 2003; Clegg *et al.*, 2003). Der Plasmainsulinspiegel ist eng mit einem hohen Anteil an viszeralem Fettgewebe korreliert, das bei männlichen Säugern überwiegt. Des Weiteren wird eine geschlechtsbedingte unterschiedliche Sensitivität gegenüber Insulin bei Ratten beschrieben (Clegg *et al.*, 2003; Galipeau *et al.*, 2002). Weibliche Tiere beantworten eine kurzzeitige subkutane Insulinapplikation durch einen 4,5-fach stärkeren Abfall der Blutglukose als Männchen, diese wiederum reagieren jedoch bei chronischer Insulinapplikation sensibler als Weibchen. Nur bei den Männchen ist diese experimentelle Hyperinsulinämie mit einer Hypertension verbunden (Galipeau *et al.*, 2002). Obwohl die vorangegangenen Studien aufgrund unterschiedlicher Fragestellungen nicht direkt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verglichen werden können, machen sie dennoch klar, dass männliche und weibliche Tiere Adipositas-relevante Parameter auf verschiedene Weise regulieren.

4.3 Untersuchung der Neuropeptidexpression im VMN und DMN

4.3.1 Die induzierte NPY Expression im VMN und DMN hängt von Alter, Körperfettgehalt und Genotyp ab

Die Ergebnisse der radioaktiven *in situ* Hybridisierung zeigten, dass NPY das einzige Neuropeptid ist, dessen Expression im VMN und DMN in den 9 Monate alten Wildtypen und den MC4R-defizienten Mäusen induziert wurde (Abb. 19). Eine POMC- und AGRP Expression in diesen Kerngebieten trat weder bei den jüngeren, noch bei den älteren Tieren auf (Abb. 18). CART wurde, wie auch zuvor in der Literatur beschrieben (Kalra *et al.*, 1999), im DMN unabhängig vom Alter exprimiert (Abb. 1). Die quantitative Bestimmung der induzierten NPY Expression mit Hilfe einer nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung bestätigte die Abwesenheit des NPY Signals im VMN und DMN in den jüngeren Tieren, zeigte aber die induzierte Expression bei den 9 Monate alten Mäusen (Abb. 20), die mit dem Körperfettgehalt der Tiere in Beziehung gesetzt werden konnte (Abb. 22). Das Verhältnis zwischen Ursache und Wirkung kann mit Regressionsanalysen natürlich nicht erklärt werden. Aber offensichtlich unterliegt die

streng positive Korrelation zwischen der Anzahl der NPY-exprimierenden Zellen im VMN und DMN und dem Körperfettgehalt bzw. der Plasmaleptinkonzentration keiner negativen Rückkopplung durch den Körperfettgehalt. Die Korrelation verläuft dementsprechend entgegengesetzt der NPY Expression im ARC, die physiologisch durch einen hohen Körperfettgehalt und einen entsprechend hohen Plasmaleptinspiegel gehemmt wird (Abb. 2).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte genotypabhängig verstärkte NPY Expression im VMN und DMN (Abb. 21; 22) deutet vielmehr an, dass eine, mit einem hohen NPY-Gehalt einhergehende Hyperphagie (Clark *et al.*, 1984; 1987; Kalra *et al.*, 1999) eher die Ursache für zunehmende Fettdeposition und steigende Plasmaleptinspiegel ist als deren Folge. Weitere Störungen in der Gewichtsregulation dieser 9 Monate alten Tiere könnten durch eine Leptinresistenz bedingt sein, die durch zunehmendes Alter und exzessive Fettdeposition verursacht wurde und mit Störungen in der Regulation der Neuropeptide im ARC einhergeht. Zusätzlich konnte eine Aktivierung von Neuronengruppen im VMN und DMN durch Leptin gezeigt werden (Elmquist *et al.*, 1998a). Würde also auch die NPY Expression im VMN und DMN der hemmenden Kontrolle von Leptin unterliegen, könnte man vermuten, dass eine sich bei den älteren Tieren entwickelnde Leptinresistenz eine Induktion von NPY in diesen Kerngebieten bewirkt hat. Interessanterweise tritt die positive Korrelation zwischen der induzierten NPY Expression im VMN und DMN und dem Körperfettgehalt zu einem Zeitpunkt auf, in dem die NPY Expression im ARC mit steigendem Körperfettgehalt immer noch zu sinken scheint (Abb. 15A), wenn auch nicht mehr signifikant. Reste einer gegenregulatorischen Kontrolle, eventuell durch Leptin als lipostatisches Signal, scheinen demnach noch vorhanden zu sein.

Eine induzierte Expression von NPY im VMN und DMN wurde mehrfach in verschiedenen genetischen Adipositasmodellen beschrieben, wie z.B. in der A^Y Maus (Kesterson *et al.*, 1997), der *tubby* Maus (Guan *et al.*, 1998) und homozygoten MC4R-defizienten Mäusen (Kesterson *et al.*, 1997). Obwohl das Alter der MC4R-defizienten Tiere in der Studie von Kesterson *et al.* nicht angegeben wurde, entspricht das Körpergewicht dieser Tiere demjenigen von 4 bis 6 Monate alten Tieren (Kesterson *et al.*, 1997; Huszar *et al.*, 1997). Bei diesen Tieren trat eine induzierte NPY Expression im VMN und DMN bei $-/-$, nicht jedoch bei $+/+$ und $+/-$ Tieren auf (Kesterson *et al.*, 1997). Allen drei genannten Adipositasmodellen ist eine Störung im Melanokortinsystem gemeinsam. Eine induzierte NPY Expression in diesen beiden Kerngebieten wurde auch bei Ratten gefunden, die einen gesteigerten Energieverbrauch zeigten, z.B. während der Laktation

(Li *et al.*, 1998). Bei Mäusen mit Diät-induzierter Adipositas wurde ebenfalls eine Induktion der NPY Neurone im VMN und DMN gezeigt (Guan *et al.*, 1998a). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen den Befund von Guan *et al.*, dass die Induktion von NPY im VMN und DMN altersabhängig zu sein scheint (Guan *et al.*, 1998a). In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig die enge positive Korrelation der Anzahl der NPY-exprimierenden Neurone im VMN und DMN mit dem Körperfettgehalt und dem Plasmaleptinspiegel nicht nur bei den MC4R-defizienten Mäusen, sondern auch bei den Wildtypen gezeigt. Das Fehlen des NPY Signals bei 56 Tage alten Tieren aller drei Genotypen (Abb. 1; 20), das frühere Auftreten des Signals in $-/-$ Mäusen (Kesterson *et al.*, 1997) und die zunehmende Signalstärke in den 9 Monate alten Tieren mit steigender Gendosis ($+/+ < +/- < -/-$; Abb. 19; 21; 22) lässt vermuten, dass das altersabhängige Auftreten einer induzierten NPY Expression im VMN und DMN durch den Defekt des MC4R bzw. die damit langfristig bestehende Adipositas verstärkt wird.

Das Auftreten der NPY-exprimierenden Neurone im VMN und DMN am Ende der fertilen Periode schließt weitere Veränderungen mit zunehmendem Alter nicht aus. So könnten sich auch die $+/-$ Tiere bezüglich der induzierten NPY Expression in einem höheren Alter deutlich von den $+/+$ Mäusen unterscheiden. Auch könnte sich die Expression von POMC, AGRP oder CART in höherem Alter verändern.

4.3.2 Wodurch könnte die NPY Expression im VMN und DMN in den 9 Monate alten MC4R-defizienten Mäusen verursacht werden?

Die Ursachen einer induzierten NPY Expression im VMN und DMN in MC4R-defizienten Mäusen stehen im Zusammenhang mit dem Alter der Tiere, wobei ein Defekt des MC4Rs das Signal in diesen hypothalamischen Kerngebieten zusätzlich verstärkt. Anhand der vorhergehend beschriebenen Befunde wurde eine Hypothese formuliert, welche die beschriebenen Veränderungen in der hypothalamischen Neuropeptidexpression und die damit verbundene Änderung in der Nahrungsaufnahme bei dem untersuchten Tiermodell erklären könnte. Sie bezieht sich auf die Neuropeptidregulation im Hypothalamus zu einem Zeitpunkt, an dem die Tiere mehrere Stunden keine Nahrung mehr aufgenommen haben, da sämtliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu diesem Zeitpunkt erhoben wurden (siehe Methoden).

Betrachtung der NPY Expression im VMN und DMN der jüngeren +/+ Tiere (Abb. 23). Die in diesem Alter schlanken Tiere haben relativ geringe Plasmaleptinspiegel, die nur temporär nach der Futteraufnahme ansteigen. Aufgrund der niedrigen Plasmaleptinkonzentration exprimieren 56 Tage alte Wildtypen wenig POMC (Abb. 3). Dementsprechend stehen am MC4R und vermutlich auch am MC3R nur geringe Mengen an α -MSH zur Verfügung (Weide *et al.*, 2003; Thornton *et al.*, 1997), das eine mögliche NPY Expression im VMN und DMN unterdrücken könnte (Kesterson *et al.*, 1997; Kalra *et al.*, 1999). Zusätzlich entfällt durch die niedrigen Leptinspiegel eine mögliche direkte Hemmung der NPY Expression in diesen Kerngebieten über den LepR-Rb (Mercer *et al.*, 1996a). Durch die fehlende Hemmung von Leptin auf die Neurone im ARC wird jedoch viel NPY und AGRP im ARC der 56 Tage alten Wildtypen exprimiert (Abb. 2; 4). Die unter 4.1.1 besprochene Hemmung der NPY Neurone im ARC (Williams *et al.*, 2001) könnte auch auf die NPY-exprimierenden Neurone im VMN und DMN übertragen werden, da NPY-haltige Projektionen vom ARC in den VMN und DMN nachgewiesen wurden (Kalra *et al.*, 1999). Deshalb kann man vermuten, dass diese Hemmung bei den jüngeren Wildtypen einen wesentlichen Einfluss auf die NPY Expression im VMN und DMN hat.

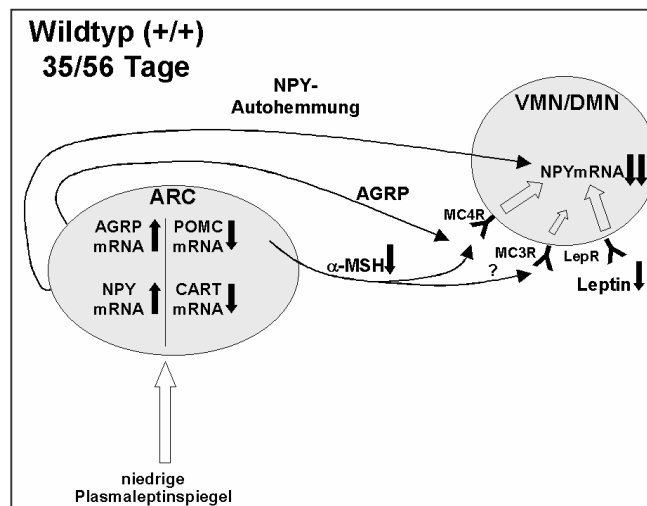


Abb. 23: Schematische Darstellung der Regulation der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus eines 35 oder 56 Tage alten Wildtyps. Die Expression von Neuropeptid Y (NPY), Pro-Opiomelanokortin (POMC), Agouti-related protein (AGRP) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART) im Nukleus arcuatus (ARC) wird durch Leptin reguliert. In den nachgeschalteten Kerngebieten des ventromedialen und dorsomedialen Hypothalamus (VMN/DMN, im Schema zu einem Kerngebiet zusammengefasst) agiert ein Produkt des POMC, das alpha-Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH) an den Melanokortinrezeptoren-3 und -4 (MC3R; MC4R), dessen natürlicher Gegenspieler das Peptid AGRP ist. NPY Neurone aus dem ARC projizieren zum VMN und DMN. Leptin reguliert Neuronenpopulationen im VMN und DMN auf direktem Wege über seinen Rezeptor (LepR). Farblose Pfeile stehen für einen Einfluss von X auf Y (X bewirkt etwas bei Y). Das Fragezeichen steht für Regulationswege die in diesem Schema hypothetisch dargestellt werden. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Betrachtung der NPY Expression im VMN und DMN der jüngeren $-/-$ Tiere (Abb. 24). Trotz des kompletten Ausfalls des MC4Rs exprimieren bis zu 56 Tage alte $-/-$ Tiere kein messbares NPY im VMN und DMN (Abb. 1; 20). Die $-/-$ Tiere weisen eine relativ zum Körperfettgehalt erhöhte NPY Expression im ARC im Vergleich zu den Wildtypen auf (Abb. 6A), wenngleich der NPY-mRNA Gehalt im ARC absolut niedriger ist und bei diesen Tieren noch der negativen Kontrolle des Körperfettgehaltes unterliegt (Abb. 2). Zusätzlich haben die $-/-$ Tiere die -sowohl relativ als auch absolut- höchsten POMC-mRNA Werte im ARC (Abb. 3; Abb. 6B).

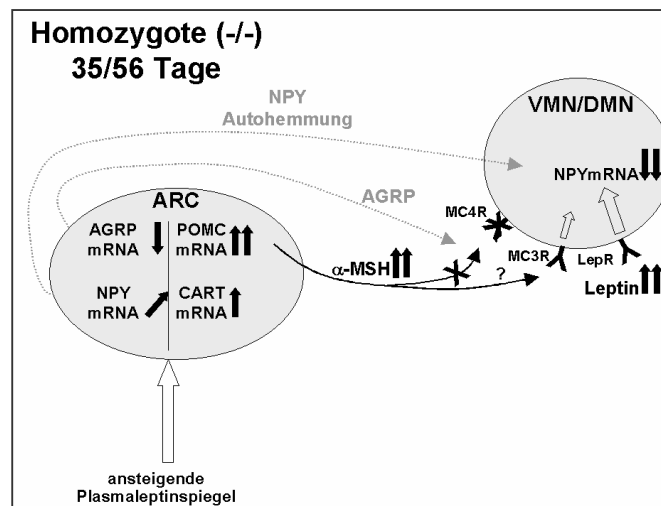


Abb. 24: Schematische Darstellung der Regulation der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus einer 35 oder 56 Tage alten homozygoten MC4R-defizienten Maus. Die Expression von Neuropeptid Y (NPY), Pro-Opiomelanokortin (POMC), Agouti-related protein (AGRP) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART) im Nukleus arcuatus (ARC) wird durch Leptin reguliert. In den nachgeschalteten Kerngebieten des ventromedialen und dorsomedialen Hypothalamus (VMN/DMN, im Schema zu einem Kerngebiet zusammengefasst) agiert ein Produkt des POMC, das alpha-Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH) an den Melanokortinrezeptoren-3 und -4 (MC3R; MC4R), dessen natürlicher Gegenspieler das Peptid AGRP ist. NPY Neurone aus dem ARC projizieren zum VMN und DMN. Leptin reguliert Neuronenpopulationen im VMN und DMN auf direktem Wege über seinen Rezeptor (LepR). Farblose Pfeile stehen für einen Einfluss von X auf Y (X bewirkt etwas bei Y). Das Fragezeichen steht für Regulationswege die in diesem Schema hypothetisch dargestellt werden. Grau-gefärbte Pfeile oder Buchstaben deuten abgeschwächte Projektionen an. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Es könnte also bei den jüngeren $-/-$ Mäusen zu einer Abnahme der NPY Projektion vom ARC zum VMN und DMN und einer daraus resultierenden geringeren Hemmung der NPY Neurone im VMN und DMN kommen. Gleichzeitig werden sehr große Mengen an α -MSH gebildet. Bei den jüngeren $-/-$ Mäusen könnte der Defekt des MC4R durch den MC3R kompensiert werden, der durch das bei diesen Tieren in hohen Konzentrationen vorhandene α -MSH aktiviert werden

könnte. Die Aktivierung vom MC3R könnte ausreichen, um die NPY Expression in diesen Kerngebieten bei jungen -/- Tieren zu hemmen (Abb. 23B). Zusätzlich könnte die angestiegene Plasmaleptinkonzentration bei den bereits adipösen 56 Tage alten -/- Tieren die Expression von NPY in diesen Kerngebieten auf direktem Wege hemmen (siehe oben). Die Abnahme von NPY in den Projektionen vom ARC zum VMN, DMN und PVN kann die bei diesen Tieren durch die fehlende Aktivierung des MC4R bedingte Hyperphagie aber offensichtlich nicht genügend abschwächen.

Aufgrund der Vermutung, dass α -MSH die NPY Expression im VMN und DMN hemmt (Kesterson *et al.*, 1997; Kalra *et al.*, 1999), müsste ein möglicher Defekt im Melanokortinsystem eine Induktion der NPY Expression in diesen Kerngebieten bewirken. Kesterson *et al.* (1997) vermuteten den MC4R Defekt als eine der Hauptursachen für die Induktion, da die Autoren nur bei homozygoten Tieren (ca. 4-6 Monate alt) eine messbare NPY Expression im DMN nachweisen konnten. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass eine Störung im Melanokortinsystem nicht zwangsweise eine NPY Expression im VMN und DMN verursacht.

Betrachtung der NPY Expression im VMN und DMN von 9 Monate alten +/- Tieren (Abb. 25, folgende Seite). Diese Tiere zeigen im Vergleich zu den jüngeren +/- Mäusen mit gleichem Fettgehalt eine leicht gesteigerte NPY Expression und eine reduzierte POMC Expression im ARC (Abb. 15). Eine altersbedingte Leptinresistenz (Li *et al.*, 1998; Scarpace *et al.*, 2002) könnte eine mögliche Rolle in der Änderung der Neuropeptidexpression im ARC spielen, die ein Absinken des verfügbaren α -MSH zur Folge hat. Es stellt sich die Frage, ob der niedrige POMC/ α -MSH Spiegel bei älteren Tieren zur Erklärung der beobachteten Induktion der NPY Neurone im VMN und DMN ausreicht. Eine Leptinresistenz könnte trotz der erhöhten Plasmaleptinkonzentration zu einer fehlenden Zügelung der NPY Induktion in diesen Kerngebieten beitragen.

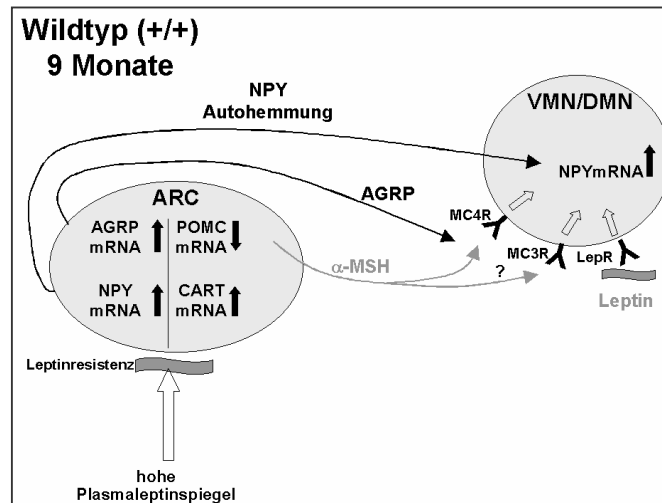


Abb. 25: Schematische Darstellung der Regulation der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus eines 9 Monate alten Wildtyps. Die Expression von Neuropeptid Y (NPY), Pro-Opiomelanokortin (POMC), Agouti-related protein (AGRP) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART) im Nukleus arcuatus (ARC) wird durch Leptin reguliert. In den nachgeschalteten Kerngebieten des ventromedialen und dorsomedialen Hypothalamus (VMN/DMN, im Schema zu einem Kerngebiet zusammengefasst) agiert ein Produkt des POMC, das alpha-Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH) an den Melanokortinrezeptoren-3 und -4 (MC3R; MC4R), dessen natürlicher Gegenspieler das Peptid AGRP ist. NPY Neurone aus dem ARC projizieren zum VMN und DMN. Leptin reguliert Neuronenpopulationen im VMN und DMN auf direktem Wege über seinen Rezeptor (LepR). Farblose Pfeile stehen für einen Einfluss von X auf Y (X bewirkt etwas bei Y). Das Fragezeichen steht für Regulationswege die in diesem Schema hypothetisch dargestellt werden. Grau-gefärbte Pfeile oder Buchstaben deuten abgeschwächte Projektionen an. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Betrachtung der NPY Expression im VMN und DMN von 9 Monate alten -/- Tieren (Abb. 26). Diese Tiere zeigen im Verhältnis zur jüngeren Kontrollgruppe eine deutlich gesteigerte Neuropeptidexpression im ARC, die unter anderem sicherlich durch eine ausgeprägte Leptinresistenz bedingt wird. Die NPY Expression im ARC liegt trotz des inzwischen deutlich höheren Körperfettgehaltes in einem ähnlichen Messbereich wie bei den jüngeren Tieren (Abb. 15A), allerdings exprimieren die Tiere mehr AGRP in diesem Kerngebiet (Abb. 15C). Die POMC Expression im ARC ist massiv abgesunken (Abb. 15B). Als einziges der untersuchten Neuropeptide bleibt die Expression von CART unverändert (Abb. 15D). Aufgrund des Fehlens des α -MSH Signals am MC4R und der gesteigerten Menge des Antagonisten AGRP, der eventuell über den MC3R wirken könnte, sowie der manifesten Leptinresistenz wird die Hemmung der NPY Neurone im VMN und DMN durch das Melanokortinsystem und Leptin aufgehoben. Die Folge ist eine sichtbar induzierte NPY Expression im VMN und DMN bei den 9 Monate alten -/- Mäusen (Abb. 19; 21E, F; Abb. 22). Die starke Induktion der NPY Neurone im

VMN und DMN könnte die deutliche Hyperphagie in den 9 Monate alten $-/-$ Tieren verstärken und letztendlich die massive Fettdeposition weiter steigern.

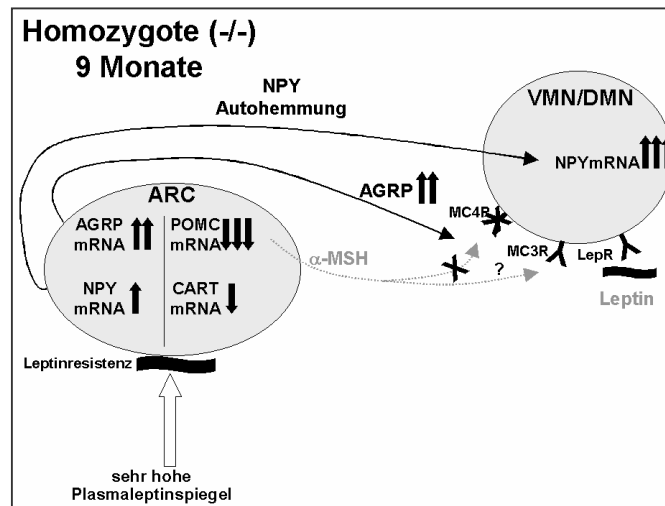


Abb. 26: Schematische Darstellung der Regulation der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus einer 9 Monate alten homozygoten MC4R-defizienten Maus. Die Expression von Neuropeptid Y (NPY), Pro-Opiomelanokortin (POMC), Agouti-related protein (AGRP) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART) im Nukleus arcuatus (ARC) wird durch Leptin reguliert. In den nachgeschalteten Kerngebieten des ventromedialen und dorsomedialen Hypothalamus (VMN/DMN, im Schema zu einem Kerngebiet zusammengefasst) agiert ein Produkt des POMC, das alpha-Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH) an den Melanokortinrezeptoren-3 und -4 (MC3R; MC4R), dessen natürlicher Gegenspieler das Peptid AGRP ist. NPY Neurone aus dem ARC projizieren zum VMN und DMN. Leptin reguliert Neuronenpopulationen im VMN und DMN auf direktem Wege über seinen Rezeptor (LepR). Farblose Pfeile stehen für einen Einfluss von X auf Y (X bewirkt etwas bei Y). Das Fragezeichen steht für Regulationswege die in diesem Schema hypothetisch dargestellt werden. Grau-gefärbte Pfeile oder Buchstaben deuten abgeschwächte Projektionen an. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4.4 Fazit und Ausblick

Durch Kombination der systemischen Analyse der Energiebilanz mit einer zellbiologischen Darstellung der Neuropeptidexpression konnte in der vorliegenden Arbeit eine Modulation altersbedingter Veränderungen in der Expression orexigener und anorexigener Neuropeptide im ARC durch den Körperfettgehalt und eine MC4R Defizienz dargestellt werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Stärke einer alters-induzierten NPY Expression im VMN und DMN vom Genotyp der Tiere abhängt (siehe auch Kesterson *et al.*, 1997). Die NPY Expression in diesen Kerngebieten unterliegt offensichtlich nicht mehr einer negativen Rückkopplung durch den Körperfettgehalt. Die stark orexigene Wirkung von NPY könnte vielmehr die streng positive

Korrelation mit dem Körperfettgehalt erklären. Weiterführende Studien mit ähnlichem Design sind sicher notwendig, um weitere systemische Parameter, die für diese positive Korrelation mitverantwortlich sein könnten (z.B. die Futtermittelaufnahme der Tiere), zu untersuchen. Darüber hinaus müssen weitere Komponenten identifiziert werden, die neben Leptin die negative Rückkopplung des Körperfettgehaltes auf die Neuropeptidexpression im ARC beeinflussen. Ebenso wichtig ist die weitere Analyse der komplexen Wechselwirkung zwischen den orexigenen und anorexigenen Neuropeptiden, um ihre Rolle in den dargestellten altersbedingten Veränderungen aufzudecken. Künftige Studien auf zell- und neurobiologischer Ebene müssen die Quantifizierung der Peptide, die Analyse von Ligand-Rezeptor-Interaktion und die Identifizierung der zugrunde liegenden neuronalen Regelkreise zum Ziel haben. Eine Bestimmung der Neuropeptidexpression auf der Ebene einzelner Neurone, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde, ist entscheidend um dieses Ziel zu erreichen. Die zell- und neurobiologische Analysen müssen allerdings mit der Bestimmung systemischer Parameter kombiniert werden, die zu definierten funktionell relevanten Zeitpunkten (z.B. verschiedene Altersstufen, Fütterungsbedingungen) ermittelt wurden. Nur durch die Kombination solcher zellbiologischen Methoden mit den systemphysiologischen Merkmalen können wichtige Informationen über die funktionelle Konsequenz von Veränderungen im neuronalen Netzwerk, das die Energiebilanz kontrolliert, gewonnen werden.

5 Zusammenfassung

In extrem adipösen Patientenkollektiven wurde bei etwa 2-4% der Probanden eine Mutation des Melanokortin-4 Rezeptor Gen (*MC4r*) nachgewiesen, die zu einer Haploinsuffizienz des Melanokortin-4 Rezeptors (MC4R) führt. In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel eines korrespondierenden Tiermodells ein möglicher Einfluss von Alter und Genotyp auf die komplexe neuronale Kontrolle des Energiehaushaltes im Hypothalamus untersucht. Die untersuchten Mäuse besitzen aufgrund eines genetischen Defektes am *MC4r* keine funktionellen MC4R (MC4R-defiziente Mäuse). Die Expression verschiedener Neuropeptide wurde im Zielgebiet des lipostatischen Hormons Leptin, dem Nukleus arcuatus (ARC), und in den dem ARC nachgeschalteten Kerngebieten des ventromedialen (VMN) und dorsomedialen (DMN) Hypothalamus ermittelt und mit physiologischen Parametern korreliert.

Die Neuropeptidexpression im ARC wird bis zu einem Alter von 56 Tagen wesentlich stärker von Körperfettgehalt bzw. Plasmaleptinkonzentration als von Genotyp und Alter bestimmt. Die Neuropeptid Y (NPY)- bzw. *Agouti*-related protein (AGRP) Expression sinkt, während die Pro-Opiomelanokortin (POMC)- bzw. Cocaine-and-Amphetamine-regulated Transcript (CART) Expression mit zunehmendem Körperfettgehalt bzw. steigender Plasmaleptinkonzentration ansteigt. Die orexigenen Peptide werden also entgegengesetzt zu den anorexigenen Peptiden beeinflusst. 9 Monate alte Tiere zeigen hingegen keine signifikante Korrelation zwischen der NPY Expression und den untersuchten Parametern. Nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes beeinflusst der Genotyp am *MC4r* die Expression aller vier Neuropeptide bei Tieren bis zu einem Alter von 56 Tagen signifikant. Bei den 9 Monate alten Mäusen konnte lediglich ein signifikanter Genotypeinfluss auf die AGRP Expression nachgewiesen werden, wobei der Genotypeneffekt umgekehrt zu dem der jüngeren Tiere ist.

Die NPY Expression im Hypothalamus ist bei den jüngeren Tieren auf den ARC beschränkt, während sie bei den 9 Monate alten Mäusen auch im VMN und DMN nachweisbar ist. POMC und AGRP werden bei allen untersuchten Altersstufen ausschließlich im ARC exprimiert. Die nachgewiesene CART Expression im DMN wird durch Alter, Genotyp oder Körperfettgehalt der Tiere nicht beeinflusst. Die Anzahl der NPY-exprimierenden Neurone im VMN und DMN ist bei den 9 Monate alten Tieren positiv mit dem Körperfettgehalt und der Plasmaleptinkonzentration korreliert. Eine weitere Zunahme der NPY Expression im VMN und DMN wurde bei -/- Tieren nachgewiesen. Die induzierte NPY Expression im VMN und DMN ist vermutlich auf das

Zusammenspiel verschiedener Faktoren zurückzuführen. Aufgrund des Körperfettgehaltes, des Genotyps und/oder des Alters kommt es bei der Neuropeptidexpression im ARC zu Verschiebungen, die zusätzlich zu einer vorhandenen Leptinresistenz und zum MC4R Defekt die NPY Expression im VMN und DMN induzieren können.

Neben den zellbiologischen Untersuchungen wurden Analysen systemphysiologischer Parameter an 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen durchgeführt. Diese systemphysiologischen Daten wurden mit bereits veröffentlichten Ergebnissen von jüngeren Tieren (Weide *et al.*, 2003) verglichen. 9 Monate alte Männchen aller drei Genotypen wiesen eine signifikant höhere Körpermasse und fettfreie Trockenmasse (FFDM) auf als die Weibchen. Während die männlichen 9 Monate alten Wildtypen höhere Werte für Körperfett aufwiesen als die Weibchen, war das Verhältnis bei den $-/-$ Tieren umgekehrt. Dabei erreichte die Mehrzahl der $-/-$ Weibchen einen maximalen Körperfettgehalt von ca. 60%. Diese Befunde unterscheiden sich von den Daten junger adulter Tiere. Ab einem Alter von 56 Tagen konnte bei fast allen untersuchten Parametern ein Gendosis-abhängiger Effekt auf die Körperzusammensetzung nachgewiesen werden. Im Alter von 35 Tagen zeigen $-/-$ Tiere signifikante Unterschiede in der Körperzusammensetzung gegenüber den $+/-$ und $+/+$ Tieren. Ein Geschlechtseinfluss lässt sich zwar bei MC4R-defizienten Tieren ab einem Alter von 21 Tagen nachweisen, es kommt jedoch im Gegensatz zu den älteren Tieren bis zu einem Alter von 2 Monaten zu keiner Interaktion zwischen Alter und Genotyp.

Bei den jüngeren Tieren stieg die Plasmaleptinkonzentration proportional zur Körperfettmasse und zum Körperfettgehalt an. Bei den 9 Monate alten Männchen und Weibchen waren Körperfettmasse und Plasmaleptinspiegel proportional, Körperfettgehalt und Plasmaleptinkonzentration exponentiell korreliert. Nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes wurde die Plasmaleptinkonzentration nur bei den 9 Monate alten Weibchen durch den Genotyp beeinflusst, die Plasmaleptinkonzentration von 9 Monate alten Männchen und jüngeren Tieren beiderlei Geschlechts erwies sich nach Herauspartialisieren des Körperfettgehaltes als Genotyp-unabhängig. Die Plasmainsulinkonzentration der 9 Monate alten Tiere zeigte bei Zunahme von Körperfettmasse und Körperfettgehalt einen exponentiellen Anstieg, diese in halb-logarithmischer Darstellung lineare Beziehung unterschied sich bei Männchen und Weibchen signifikant. Ein Einfluss des Genotyps auf die Plasmainsulinkonzentration konnte nicht nachgewiesen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine MC4R Defizienz einen Prozess einleitet, der mit zunehmendem Alter zu einer zunehmenden Entgleisung des zentralen Signalwegs im multifaktoriellen Kontrollsystem des Energiehaushaltes führt und sich dadurch letztendlich auf die Körperzusammensetzung von MC4R-defizienten Mäusen auswirkt.

6 Summary

In several studies about 2-4% of extremely obese patients were found to have mutations in the melanocortin-4 receptor gene (*MC4r*), presumably leading to haploinsufficiency of the melanocortin-4 receptor (MC4R). We used the corresponding animal model to analyze the effects of age and genotype at *MC4r* on the complex neural circuits of energy balance control in the hypothalamus. In the present study on the MC4R-deficient mouse the neuropeptide expression in neurons of the arcuate nucleus (ARC), the primary neural target of the lipostatic hormone leptin, and the ventromedial (VMN) and dorsomedial hypothalamus (DMN), two downstream targets, were analyzed and then correlated with systemic parameters.

Neuropeptide expression in the ARC of mice, up to 56 days of age, is influenced more by body fat content and plasma leptin levels than by age or genotype. The expression of neuropeptide Y (NPY) and *Agouti*-related protein (AGRP) is down-regulated, whereas the expression of pro-Opiomelanocortin (POMC) and Cocaine-and-amphetamine-regulated transcript (CART) is up-regulated with increasing body fat content. The expressions of the antagonistic peptides in the ARC are oppositely regulated in a counter-regulatory manner in relation to body fat content and plasma leptin levels. At the age of 9 months, however, neuropeptide expression is no longer significantly correlated with body fat content. After partializing out the influence of body fat content, genotype at *MC4r* significantly influences the expression of all four neuropeptides in the ARC in young mice, whereas in 9 month old mice genotype dependence is significant only for AGRP and, moreover, opposite in direction to that in younger animals.

The expression of NPY is restricted to the ARC in 35-56 day old mice, but has expanded to the neighboring DMN and VMN at the age of 9 months. POMC and AGRP are not expressed in these nuclei up to this age, and the constitutive expression of CART in the DMN is not affected by age, fat content and genotype. Most importantly, at 9 months of age the number of NPY-expressing DMN and VMN neurons correlates positively with body fat content and plasma leptin concentration, i.e., the relationship is opposite to the negative feedback response found for NPY expression in the ARC of the younger mice. Moreover, an excess increase in the number of NPY-expressing DMN and VMN neurons is seen in the *-/-* mice.

The cell biological data of the present study were combined with system physiological results of 9 month old wild type and MC4R-deficient mice, which were compared with system physiological results of published data from younger animals (Weide *et al.*, 2003). 9 month old male animals of all three genotypes showed a significantly higher body mass and fat free dry mass (FFDM) than the females. While male wild types had higher body fat content than females it was opposite in the $-/-$ animals. Most of the $-/-$ females reached the maximum of 60% body fat content. These results were different from the data of the younger animals. By 56 days of age a gene-dosage dependent effect on nearly all investigated parameters were found, by 35 days of age the $-/-$ mice showed significantly differences in body composition than $+/-$ and $+/+$ animals. Although significant sex differences were observed from day 21 onward, no genotype x sex interactions were found.

In younger animals plasma leptin concentration increased proportionally to body fat mass and body fat content, whereas in 9 month old male and female mice the increase of plasma leptin concentration was proportional to only body fat mass, whereas it was exponentially related to body fat content. After partializing out the influence of body fat content, plasma leptin concentration was affected by the genotype only in 9 month old females but not in males and in younger animals. In 9 month old animals plasma insulin concentration increased exponentially with both body fat mass and body fat content. This relationship was linear in a semi-logarithmic plot and was significantly different in females and males. No genotype effect was found for the plasma insulin concentration.

The present data suggest that MC4R deficiency initiates a lifelong process of deteriorating central signaling within the multi-factorial control system for energy balance with the consequence of changes in body composition of MC4R-deficient mice. Increasing age seems to affect this process and to enhance the massive fat deposition in 9 month old $-/-$ mice.

7 Anhang – verwendete Chemikalien und Lösungen

7.1 Klonierung

7.1.1 Plasmidisolierung

- 15% Glycerin (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
- LB-Medium (Invitrogen life technologies, Paisley, UK)
- Ampicillin (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD), Stammlösung (100 mg/ml) gelagert bei –20°C
- Eppendorfcup (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, BRD)
- Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, USA), gelagert bei –20°C

7.1.2 Plasmidlinearisierung

- Puffer (A); Puffer (4) (Promega Corporation, Madison, USA)
- Enzyme SmaI; FspI; ApaI, SacI (Promega Corporation, Madison, USA)
- Quiagen Purification Kit (Quiagen GmbH, Hilden, BRD)

7.1.3 Herstellung des Agarose-Gels

- Herstellen von 0,5x TBE-Puffer
 - 54 g Tris (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 27,5 g Borsäure (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
 - 20 ml EDTA 0,5M, pH 8 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)ad 5 l *Aqua dest.*
- 1% Agarose (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD)
durch Erhitzen auflösen, anschließend
- 10%iges Ethidiumbromid (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD)
einrühren, Gel erkalten lassen

7.1.4 Durchführung

- Farbstoff und DNA-Marker (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD), gelagert bei +4°C

7.2 *In situ* Hybridisierung

7.2.1 Beschichten der Objektträger

- Herstellen von DEPC-Wasser
 - *Aqua dest.*
 - 0,1% Diethyl-Pyrocarnat (DEPC) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD), gelagert bei +4°C,
über Nacht auf einem Rührgerät im Abzug stehen lassen, um RNAsen zu inaktivieren, anschließendes Autoklavieren spaltet das toxische DEPC-Molekül in flüchtiges CO₂ und Ethanol

- Ansetzen der 5%igen Gelatine-Lösung
 - 1,5 g Gelatine (G-2500), (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 300 ml DEPC-Wasser
 - 0,15 g $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (VWR International, Poole, UK)
- Ansetzen der Poly-L-Lysin-Lösung:
 - 25 mg Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 300 ml DEPC-Wasser
 - 3 ml 1M TRIS (pH8) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)

7.2.2 Schneiden der Gehirne

- Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL)
- Ethanol vergällt (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

7.3 Radioaktive *in situ* Hybridisierung

7.3.1 Herstellung der RNA-Sonde

- Ansetzen des 0,75M Dithiothreitol (DTT) (als Aliquot bei -20°C gelagert)
- 2,32 g DTT (Promega Corporation, Madison, USA)
 - 20 ml 0,01M Sodiumacetat (pH 5,2; mit DEPC-Wasser angesetzt) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 5x Transkriptionspuffer, Bestandteil des Promega Riboprobe® in vitro Transcription Systems-Kits (Promega Corporation, Madison, USA), bei -20°C gelagert
 - linearisierte Plasmid-DNA, bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert
 - rNTP-1:1:1 Mix (ATP, GTP, CTP, ursprüngliche Basenkonzentration 10 mM Bestandteil des Promega Riboprobe® in vitro Transcription Systems-Kits (Promega Corporation, Madison, USA), bei -20°C gelagert
 - RNase Block I (38,2 U/ μl) (Nycomed Amersham plc, Little Chalfont, UK), bei -20°C gelagert
 - ^{35}S -UTP (12,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) (NEN PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, USA), bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert
 - RNA-Polymerase (Promega Corporation, Madison, USA), bei -20°C gelagert
 - DEPC-Wasser
 - DNase (1 U/ μl), Bestandteil des Promega Riboprobe® in vitro Transcription Systems-Kits (Promega Corporation, Madison, USA), bei -20°C gelagert
 - MicroSpin™ G-50 Columns (Amersham Pharmacia Biotech Inc., New Jersey, USA)
 - Szintillationsflüssigkeit (PerkinElmer Inc., Boston, USA)

7.3.2 Ansetzen des Hybridisierungspuffers

- Herstellung von Dextransulfat:
 - 1,5 ml DEPC-Wasser
 - 1 g Dextransulfat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 auf 60°C erwärmen, nach ca. 1 Stunde stark vortexen, für eine weitere halbe Stunde erwärmen bis das Dextransulfat vollständig gelöst ist.
- Herstellung von 5M NaCl:
 - 29,22 g NaCl (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 100 ml *Aqua dest.*
 - 1% DEPC, über Nacht stehen lassen, autoklavieren und als Aliquot bei -20°C lagern

- Herstellung des 1M TRIS (pH 8)
 - 12,11 g TRIS (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 80 ml DEPC-Wasser
 das vorkalibrierte pH-Meter über nacht mit DEPC behandeln, den pH-Wert mit HCl einstellen und auf 100 ml mit DEPC-Wasser auffüllen, bei -20°C als Aliquot lagern.
- Herstellung von 0,5M EDTA (pH 8)
 - 18,61 g EDTA (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 80 ml *Aqua-dest.*
 der pH-Wert wird mit NaOH eingestellt, Lösung auf 100 ml auffüllen und mit DEPC behandeln, als Aliquot bei -20°C lagern
- Formamid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD), bei -20°C als Aliquot gelagert
- 50x Denhardts-Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD), bei -20°C als Aliquot gelagert
- DEPC-Wasser

7.3.3 Herstellung der Hybridisierungslösung

- Herstellung von 1M DTT
 - 3,09 g DTT (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 20 ml 0,01M Sodiumacetat (pH 5,2, mit DEPC-Wasser angesetzt), (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD),
 bei -20°C als Aliquot gelagert
- tRNA (3,9 mg/ml, E.Coli MRE 600) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
- *sense*- oder *antisense*-Sonde, Herstellung siehe Punkt 1.3.3
- Hybridisierungspuffer, Herstellung siehe Punkt 1.3.4
- DEPC-Wasser

7.3.4 Hybridisierung

- Herstellen von 0,2M Phosphatpuffer (PB)
 - 11,36 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 45,44 g Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 2 l *Aqua dest.*
 über Nacht mit DEPC behandeln, bei Raumtemperatur lagern
 zur Herstellung von 0,1M PB wird der 0,2M PB 1:1 mit DEPC-Wasser verdünnt.
- Herstellen von 4%igem Paraformaldehyd
 - 24 g Paraformaldehyd (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 300 ml DEPC-Wasser
 unter Rühren auf 60°C erhitzen, anschließend
 - 24 Tropfen 10N NaOH (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 zugeben, bis die Lösung klar wird, nach dem Abkühlen 1:2 mit 0,2M PB verdünnen und auf Eis stellen.
- Herstellen der aufsteigenden Alkoholreihe (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)

- 50% EtOH	250 ml Alkohol abs.	+	250 ml DEPC-Wasser
- 70% EtOH	350 ml	+	150 ml
- 95% EtOH	476 ml	+	24 ml
- 100% EtOH	500 ml		

- Hybridisierungslösung, Herstellung siehe oben
- DPX (Riedel-de Haen Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, BRD)

7.3.5 Posthybridisierung

- Herstellen von 20x SSC (NaCl/Natriumcitrat-Puffer)
 - 175,3 g NaCl (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 88,2 g Trisodiumcitrat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 1 l *Aqua dest.*
 über Nacht mit DEPC behandeln, bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung von 4x SSC wird die Lösung 1:5 mit DEPC-Wasser verdünnt.
- Ansetzen der SSC-Verdünnungen

- 2,0x SSC	500,0 ml 4x SSC +	500,0 ml <i>Aqua dest.</i>	+ 1,0 ml DTT
- 1,0x SSC	375,0 ml	+ 375,0 ml	+ 0,5 ml
- 0,5x SSC	62,5 ml	+ 437,5 ml	+ 0,5 ml
- 0,1x SSC	25,0 ml	+ 975,0 ml	+ 1,0 ml
- 5M NaCl, Herstellung siehe oben
- 1M Tris (pH 8), Herstellung siehe oben
- 0,5M EDTA, Herstellung siehe oben
- *Aqua dest.*
- RNase, 10 mg/ml, 1:100 verdünnt (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD), bei -20°C als Aliquot gelagert
- Autoradiographie [¹⁴C] micro-scales, Code RPA 504 (Nycomed Amersham plc, Little Chalfont, UK)
- Kodak Biomax MR Film, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)

7.3.6 Filmentwicklung

- Entwickler (Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie, Köln, BRD)
- Fixierer (Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie, Köln, BRD)

7.4 Nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung

7.4.1 RNA-Markierung

- Folgende Substanzen sind Bestandteil des DIG RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, BRD):
 - 5x Puffer
 - NTP-Labeling Mixture
 - RNA-Polymerase
 - RNase Inhibitor
 - DNase
- Plasmid-DNA (NPY oder POMC), Herstellung siehe oben
- DEPC-Wasser
- verwendete Lösungen zum Abstoppen der Transkriptionsreaktion:
 - LiCl (4 mol/l) (Merck KgaA, Darmstadt, BRD) in DEPC-Wasser, bei 4°C gelagert
 - EDTA (0,2 mol/l) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD) in DEPC-Wasser,
 - 100% Ethanol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD), bei -20°C gelagert,
 - 70% Ethanol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD), mit DEPC-Wasser verdünnt, bei -20°C gelagert

- DEPC-Wasser

7.4.2 Dot Blot zur Sondenkontrolle

- Herstellung des Malein-Puffers (pH 7,5):
 - 1,16 g Maleinsäure (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
 - 0,88 g NaCl (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
 - auf 100 ml *Aqua dest.* auffüllen.
- Herstellung des Waschpuffers:
 - 50 ml Malein-Puffer
 - 150 µl Tween 20 (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
- Herstellung des Blockpuffers:
 - 0,5 g Blocking Reagent (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, USA)
 - 50 ml Malein-Puffer
- Herstellung des „Detection“-Puffers:
 - 0,6 g Tris (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 0,3 g NaCl (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
- DIG-labeled Control RNA (Bestandteil des DIG RNA Labeling Kit, Boehringer Mannheim, BRD)
- DEPC-Wasser
- RNA-Sonde (siehe oben)
- Hybond Nylon N⁺-Membran (Amersham plc, Little Chalfont, UK)
- NBT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
- BCIP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
- *Aqua dest.*

7.4.3 Herstellung der Hybridisierungslösung

- Formamid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - Herstellung des 33%igen Dextransulfat:
 - 800 mg Dextransulfat
 - 2400 µl DEPC-Wasser, unter Rühren auflösen
 - Herstellung des 20x SSC (NaCl/Natriumcitrat-Puffer):
 - 87,65 g NaCl (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
 - 50,25 g tri-NaCitrat x H₂O (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
- ad 500 ml *Aqua dest.*, pH-Wert mit 1N NaOH auf 7,0 einstellen, über Nacht mit DEPC behandeln, autoklavieren
- 50x Denhardts (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD), aliquotiert und bei – 20°C gelagert
 - Salmon Testes DNA (11mg/ml) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - Herstellung des 1 M 1,4-Dithio-DL-treitol (DTT):
 - 0,77 g DTT (Riedel-de Haen Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, BRD)
 - 5 ml DEPC-Wasser
- Aliquots bei -20°C lagern
- DEPC-Wasser
 - DIG-RNA-Sonde

7.4.4 Hybridisierung

- Herstellung des 10x Phosphatpuffers (PB), pH 7,2:
 - 8,06 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
 - 1,04 g KH_2PO_4 (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
 - 1,04 g KCl (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
 - 40,00 g NaCl (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
 ad 500 ml *Aqua dest.*, über Nacht mit 0,1% DEPC behandeln, anschließend autoklavieren.
 Zur Herstellung von 1x PB wird der 10x PB 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt.
- Herstellung von 4%igem Paraformaldehyd:
 - 20g Paraformaldehyd (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 250 ml DEPC-Wasser
 unter Rühren auf 60°C erhitzen, 3-4 Tropfen 1M NaOH zugeben, anschließend filtrieren und
 - 50 ml 10x PB zugeben
 - mit DEPC-Wasser auf 500 ml auffüllen
- Herstellung von 0,05 M Tris-Puffer (pH 7,6)
 - 1,21 g Tris (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 200 ml DEPC-Wasser
 - 1 ml 25% HCl
- Herstellung der Proteinase K-Lösung:
 - 2,5 µl Stammlösung (1 mg/ml) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, BRD)
 - 1 ml 0,05M Tris-Puffer (pH 7,6)

7.4.5 Posthybridisierung

- Ansetzen der SSC-Verdünnungen:

- 2,0x SSC=	50 ml 20x SSC	+	450 ml <i>Aqua dest.</i>
- 1,0x SSC=	25 ml 20x SSC	+	475 ml <i>Aqua dest.</i>
- 0,2x SSC=	5 ml 20x SSC	+	495 ml <i>Aqua dest.</i>
- Herstellung des Block-Puffers:
 - 0,5 g Bovines-Serum-Albumin (Albumin Fraktion V), (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD)
 - 50 µl Triton X-100 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 1 ml 10x PB
 mit *Aqua dest.* auf 10 ml auffüllen, gut vortexen
- Herstellung der Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Lösung:
 - 3 µl Anti-DIG-Alkalische Phosphatase (150 U) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
 - 1800 µl Block-Puffer
- Herstellung des Alkalische Phosphatase-Puffers (AP-Puffer) (pH 9,5):
 - 2,42 g Tris (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)
 - 1,16 g NaCl (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
 - 2,03 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck KgaA, Darmstadt, BRD) ad 200 ml *Aqua dest.*
- Herstellung der Farblösung:
 - 4,5 µl NBT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
 - 3,5 µl BCIP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD)
 ad 1 ml AP-Puffer
- *Aqua dest.*
- Entellan (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)

8 Literaturverzeichnis

- Abbott CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA, Zollner AN, Morgan DG, Morgan I, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR (2001).** Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* 142(8): 3457-3463.
- Abott RD, Behrens GR, Sharp DS, Rodriguez BL, Burchfiel CM, Ross W, Yano K, Curb JD (1994).** Body mass index and thromboembolic stroke in nonsmoking men in older middle age: the Honolulu Heart Program. *Stroke* 25: 2370-2376.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS (1996).** Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382(6588): 250-252.
- Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S, Flier JS (1999).** Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology* 140(6): 2755-2762.
- Ahima RS, Flier JS (2000).** Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413-437.
- Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK (2000).** Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21(3): 263-307.
- Air EL, Benoit SC, Blake Smith KA, Clegg DJ, Woods SC (2002).** Acute third ventricle administration of insulin decreases food intake in two paradigms. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 423-429.
- Alpert MA, Hashimi MW (1993).** Obesity and the heart. *Am J Med Sci* 306(2): 117-123.
- Anand BK, Brobeck JR (1951).** Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24: 123-146.
- Aravich PF, Sclafani A (1983).** Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav Neurosci* 97: 970-983.
- Assmann G, Schulte H (1992).** Role of triglycerides in coronary artery disease: lessons from the Prospective Cardiovascular Munster Study. *Am J Cardiol* 70(19): 10H-13H.
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ (1998).** The stomach is a source of leptin. *Nature* 394: 790-793.
- Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS, Watson SJ (1999).** Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and Proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* 19(18): RC26 1-7.
- Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, Tohyama M (1985).** An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks nor-adrenaline in the rat. *Brain Res* 331: 172-175.

- Baker RA, Herkenham M (1995).** Arcuate nucleus neurons that project to the hypothalamic paraventricular nucleus: neuropeptidergic identity and consequences of adrenalectomy on mRNA levels in the rat. *J Comp Neurol* 358: 518–530.
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM (1996).** Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17(2): 305-311.
- Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW (1997).** Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 138(10): 4463-4472.
- Barsch GS, Farooqi S, O’Rahilly S (2000).** Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404: 644-651.
- Baskin DG, Hahn TM, Schwartz MW (1999a).** Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm Metab Res* 31(5): 345-350.
- Baskin DG, Lattemann DF, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW (1999b).** Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Research* 848: 114-123.
- Behre HM, Simoni M, Nieschlag E (1997).** Strong association between serum levels of leptin and testosterone in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 47(2): 237-240.
- Bergendahl M, Wiemann JN, Clifton DK, Huhtaniemi I, Steiner RA (1992).** Short-term starvation decreases POMC mRNA but does not alter GnRH mRNA in the brain of adult male rats. *Neuroendocrinology* 56(6): 913-920.
- Bernardis LL, Bellinger LL (1987).** The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res* 434: 321–381.
- Berti L, Kellerer M, Capp E, Haring HU (1997).** Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a P13-kinase mediated effect. *Diabetologia* 40(5): 606-609.
- Bi S, Gavrilova O, Gong DW, Marcus-Samuels B, Mason MM, Reitman ML (1999).** Leptin and reproduction. *J Clin Ligand Assay* 22: 236-238.
- Billington CJ, Briggs JE, Harker S, Grace M, Levine AS (1994).** Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* 266(6 Pt 2): R1765-1770.
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS (1998).** Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139(8): 3485-3491.
- Blasquez C, Jegou S, Tranchand-Bunel D, Fournier A, Vaudry H (1992).** Neuropeptide Y inhibits α -MSH release from rat hypothalamic slices through a pertussis toxin-sensitive G protein. *Brain Research* 596: 163-168.

- Boden G, Chen X, Kolaczynski JW, Polansky M (1997).** Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest* 100(5): 1107-1113.
- Bortz J (1989).** Statistik für Sozialwissenschaftler, 3. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bousquet C, Zatelli MC, Melmed S (2000).** Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *J Clin Invest* 106(11): 1417-1425.
- Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M (1990).** Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52(5): 441-447.
- Brobeck JR (1946).** Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol Rev* 26: 541-559.
- Broberger C, Landry M, Wong H, Walsh J, Hökfelt T (1997).** Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 66: 393-408.
- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T (1998).** The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25): 15043-15048.
- Broberger C (1999).** Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* 848(1-2): 101-113.
- Brownlee KA (1965).** Statistical theory and methodology in science and engineering. J Wiley & Sons Inc., New York, London, Sydney.
- Casabiell X, Pineiro V, Peino R, Lage M, Camina J, Gallego R, Vallejo LG, Dieguez C, Casanueva FF (1998).** Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab* 83(6): 2149-2155.
- Chagnon YC, Rankinen T, Snyder EE, Weisnagel SJ, Perusse L, Bouchard C (2003).** The human obesity gene map: the 2002 update. *Obes Res* 11(3): 313-367.
- Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC (1994).** Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 17(9): 961-969.
- Chen AS, Metzger JM, Trumbauer ME, Guan XM, Yu H, Frazier EG, Marsh DJ, Forrest MJ, Gopal-Truter S, Fisher J, Camacho RE, Strack AM, Mellin TN, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH (2000).** Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res* 9(2): 145-154.

- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP (1996).** Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84(3): 491-495.
- Chen SC, Kochan JP, Campfield LA, Burn P, Smeyne RJ (1999).** Splice variants of the OB receptor gene are differentially expressed in brain and peripheral tissues of mice. *J Recept Signal Transduct Res* 19(1-4): 245-266.
- Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997).** Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138(10): 4489-4492.
- Christ N, Hinney A, Schmidt I (2002).** Onset of excessive fat deposition in melanocortin-4 receptor-knockout (MC4R-KO) mice.
- Chronwall BB (1988).** Anatomical distribution of NPY and NPY messenger RNA in the brain. In: Mutt V, Fuxe K, Hökfelt T, Lundberg JD (eds) *Neuropeptide Y*. Raven Press, New York, pp. 51-60.
- Chua SC, Leibel RL, Hirsch J (1991).** Food deprivation and age modulate neuropeptide gene expression in the murine hypothalamus and adrenal gland. *Mol Brain Res* 9: 95-101.
- Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS (1996).** Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 271: 994-996.
- Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP (1984).** Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115(1): 427-429.
- Clark JT, Sahu A, Kalra PS, Balasubramaniam A, Kalra SP (1987).** Neuropeptide Y (NPY)-induced feeding behavior in female rats: comparison with human NPY ([Met17]NPY), NPY analog ([norLeu4]NPY) and peptide YY. *Regul Pept* 17(1): 31-39.
- Clegg DJ, Riedy CA, Smith KA, Benoit SC, Woods SC (2003).** Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes* 52(3): 682-687.
- Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Cohen B, Novick D, Rubinstein M (1998).** Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274(5290): 1185-1188.
- Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, Arky RA, Speizer FE (1990).** Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *Am J Epidemiol* 132(3): 501-513.
- Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE (1995).** Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med* 122(7): 481-486.
- Coleman DL (1973).** Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9: 294-298.
- Coleman RA, Herrmann TS (1999).** Nutritional regulation of leptin in humans. *Diabetologia* 42(6): 639-646.

- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ (2001).** The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001 Dec; 25 Suppl 5: S63-7.
- Considine RV, Caro JF (1997).** Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol* 29(11): 1255-1272.
- Considine RV, Nyce MR, Kolaczynski JW, Zhang PL, Ohannesian JP, Moore JH Jr, Fox JW, Caro JF (1997).** Dexamethasone stimulates leptin release from human adipocytes: unexpected inhibition by insulin. *J Cell Biochem* 65(2): 254-258.
- Cool DR, Normant E, Shen F, Chen HC, Pannell L, Zhang Y, Loh YP (1997).** Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell* 88(1): 73-83.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001).** Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411: 480-484.
- Criscione L, Rigollier P, Bazl-Harmann C, Rüeger H, Stricker-Krongrad A, Whitebread S, Yamaguchi Y, Walker MW, Gerald C, Chiesi M, Levens N, Schilling W, Hofbauer KG (1997).** Inhibition of food intake in rodents induced by a selective antagonist of the neuropeptide Y Y5 receptor subtype. Program of the 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, LA, Vol 23: 575.
- Csiffary A, Gorcs TJ, Palkovits M (1990).** Neuropeptide Y innervation of ACTH-immunoreactive neurons in the arcuate nucleus of rats: a correlated light and electron microscopic double immunolabeling study. *Brain Res* 506: 215-222.
- Cumin F, Baum HP, Levens N (1996).** Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: 1120-1126.
- Cumin F, Baum HP, Levens N (1997).** Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. *J Endocrinol* 155: 577-585.
- Cummings DE, Schwartz MW (2000).** Melanocortins and body weight: a tale of two receptors. *Nat Genet* 26(1): 8-9.
- Daniels AJ, Matthews JE, Slepatis RJ, Jansen M, Viveros OH, Tadepalli A, Harrington W, Heyer D, Landavazo A, Leban JJ, Spaltenstein A (1995).** High-affinity neuropeptide Y receptor antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9067-9071.
- Despres JP (1991).** Lipoprotein metabolism in visceral obesity. *Int J Obes* 15 Suppl 2: 45-52.
- Dessolin S, Schalling M, Champigny O, Lonnqvist F, Ailhaud G, Dani C, Ricquier D (1997).** Leptin gene is expressed in rat brown adipose tissue at birth. *FASEB J* 11(5): 382-387.

- Dhillon WS, Small CJ, Stanley SA, Jethwa PH, Seal LJ, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR (2002).** Hypothalamic interaction between neuropeptide Y, Agouti-related protein, cocaine- and amphetamine-regulated transcript and alpha-melanocyte-stimulating hormone in vitro in male rats. *J Neuroendocrinology* 14: 725-730.
- Dhillon H, Ge YL, Minter RM, Prima V, Moldawer LL, Muzyczka N, Zolotukhin S, Kalra PS, Kalra SP (2000).** Long-term differential modulation of genes encoding orexigenic and anorexigenic peptides by leptin delivered by rAAV vector in *ob/ob* mice. Relationship with body weight change. *Regul Pept* 92: 97-105.
- Dhillon H, Kalra SP, Kalra PS (2001).** Dose-Dependent Effects of Central Leptin gene therapy on Genes That Regulate Body Weight and Appetite in the Hypothalamus. *Molecular therapy* 4(2): 139-145.
- Dong W, Seidel B, Marcinkiewicz M, Chretien M, Seidah NG, Day R (1997).** Cellular localization of the prohormone convertases in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei: selective regulation of PC1 in corticotrophin-releasing hormone parvocellular neurons mediated by glucocorticoids. *J Neurosci* 17(2): 563-575.
- Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P (1995).** PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 15(3 Pt 2): 2471-2481.
- Douglass J, Daoud S (1996).** Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene* 169(2): 241-245.
- Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS, Kalra SP (1992).** Neuropeptide Y (NPY) concentration is decreased in the paraventricular nucleus (PVN) of rats exhibiting excessive weight gain produced by ventromedial hypothalamic lesions. Program of the 22nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Anaheim, CA, 1992, Vol 18: 937.
- Dube MG, Xu B, Kalra PS, Sninsky CA, Kalra SP (1999).** Disruption in neuropeptide Y and leptin signaling in obese ventromedial hypothalamic-lesioned rats. *Brain Res* 816: 38-46.
- Dumont T, Jacques D, St. Pierre J-A, Quirion R (1997).** Neuropeptide Y receptor types in the mammalian brain: species differences and status in the human central nervous system. In: Grundermar L, Bloom S (eds) *Neuropeptide Y and Drug Development*. Academic Press, New York, pp 57-86.
- Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA (1991).** Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol* 260(2 Pt 2): R328-334.
- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK (1998).** Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21(6): 1375-1385.
- Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB (1998).** Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395(4): 535-547.

- Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB (1998a).** Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci* 95: 741-746.
- Elmquist JK, Elias CF, Saper CB (1999).** From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22(2): 221-232.
- Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M (1997).** Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 46(2): 313-316.
- Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD (1996a).** Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274(5293): 1704-1707.
- Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD (1996b).** Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381(6581): 415-421.
- Evans BA, Agar L, Summers RJ (1999).** The role of the sympathetic nervous system in the regulation of leptin synthesis in C57BL/6 mice. *FEBS Lett* 444(2-3): 149-154.
- Everett E, Tamimi H, Greer B, Swisher E, Paley P, Mandel L, Goff B (2003).** The effect of body mass index on clinical/pathologic features, surgical morbidity, and outcome in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 90(1): 150-157.
- Everitt BJ & Hökfelt T (1989).** The coexistence of neuropeptide Y with other peptides and amines in the central nervous system. In: Mutt V, Fuxe K, Hökfelt T, Lundberg J (eds) *Neuropeptide Y*. Raven Press, New York, pp 61-72.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD (1997).** Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385(6612): 165-168.
- Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S (2000).** Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106(2): 271-279.
- Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM (1997).** Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13): 7001-7005.
- Felson DT (1992).** Obesity and osteoarthritis of the knee. *Bull Rheum Dis* 41(2): 6-7.
- Ferrannini E (1995).** Physiological and metabolic consequences of obesity. *Metabolism* 44(9 Suppl 3): 15-17.
- Flier JS (1998).** What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1407-1413.
- Flood JF, Morley JE (1989).** Dissociation of the effects of neuropeptide Y on feeding and memory: Evidence for pre- and postsynaptic mediation. *Peptides* 10: 963-966.

- Fong TM, Mao C, MacNeil T, Kalyani R, Smith T, Weinberg D, Tota MR, Van der Ploeg LHT (1997).** ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 629-631.
- Franklin KBJ, Paxinos G (1997).** The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto
- Friedman JM (1997).** The alphabet of weight control. *Nature* 385(6612): 119-120.
- Friedman JM, Halaas JL (1998).** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.
- Füxe K, Tinner B, Caberlotto L, Bunnemann B, Agnati LF (1997).** NPY Y1 receptor-like immunoreactivity exists in a subpopulation of beta-endorphin immunoreactive nerve cells in the arcuate nucleus: a double immunolabeling analysis in the rat. *Neurosci Lett* 225: 49-52.
- Galipeau DM, Yao L, McNeill JH (2002).** Relationship among hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypertension is dependent on sex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H562-H567.
- Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson SJ, DelValle J, Yamada T (1993a).** Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268(11): 8246-8250.
- Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ, DelValle J, Yamada T (1993b).** Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268(20): 15174-15179.
- Garcia De Yebenes E, Li S, Fournier A, St-Pierre S, Pelletier G (1995).** Regulation of proopiomelanocortin gene expression by neuropeptide Y in the rat arcuate nucleus. *Brain Research* 674: 112-116.
- Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF (1997).** Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab* 82(9): 2849-2855.
- Gayle D, Ilyin SE, Romanovitch AE, Peloso E, Satinoff E, Plata-Salamán CR (1999).** Basal and IL-1 β -stimulated cytokine and neuropeptide mRNA expression in brain regions of young and old Long-Evans rats. *Mol Brain Res* 70: 92-100.
- Gerald C, Walker MW, Criscione L, Gustafson EL, Batzl-Hartmann C, Smith KE, Vaysse P, Durkin MM, Laz TM, Linemeyer DL, Schaffhauser AO, Whitebread S, Hofbauer KG, Taber RI, Branchek TA, Weinshank RL (1996).** A receptor subtype involved in neuropeptide Y-induced food intake. *Nature* 382: 168-171.
- Gerlai R (1996).** Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *TINS* 19(5): 177-181.
- Gerozissis K (2002).** Brain Insulin: Regulation, Mechanisms of Action and Functions. *Cell Mol Neurobiol* 23(1): 1-25.

- Gettys TW, Harkness PJ, Watson PM (1996).** The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 137(9): 4054-4057.
- Gingrich JA, Hen R (2000).** Commentary: The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr Op Neurobiol* 10: 146-152.
- Glaum SR, Hara M, Bindokas VP, Lee CC, Polonsky KS, Bell GI, Miller RJ (1996).** Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus. *Mol Pharmacol* 50: 230-235.
- Greisen S, Ledet T, Moller N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Petersen K, Ovesen P (2000).** Effects of leptin on basal and FSH stimulated steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79(11): 931-935.
- Grieco P, Balse PM, Weinberg D, MacNeil T, Hruby VJ (2000).** D-Amino acid scan of gamma-melanocyte-stimulating hormone: importance of Trp(8) on human MC3 receptor selectivity. *J Med Chem* 43: 4998-5002.
- Gross PM (1992).** Circumventricular organ capillaries. *Prog Brain Res* 91: 219-233.
- Gruenewald DA, Marck BT, Matsumoto AM (1996).** Fasting-induced increases in food intake and neuropeptide Y gene expression are attenuated in aging male brown Norway rats. *Endocrinology* 137: 4460-4467.
- Gu W, Tu Z, Kleyn PW, Kissebah A, Duprat L, Lee J, Chin W, Maruti S, Deng N, Fisher SL, Franco LS, Burn P, Yagaloff KA, Nathan J, Heymsfield S, Albu J, Pi-Sunyer FX, Allison DB (1999).** Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes* 48(3): 635-639.
- Guan XM, Hess JF, Yu H, Hey PJ, van der Ploeg LH (1997).** Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain. *Mol Cell Endocrinol* 133(1): 1-7.
- Guan XM, Yu H, Van der Ploeg LHT (1998).** Evidence of altered hypothalamic proopiomelanocortin/ neuropeptide Y mRNA expression in tubby mice. *Brain Res Mol Brain Res* 59: 273-279.
- Guan XM, Yu H, Trumbauer M, Frazier E, Van der Ploeg LHT, Chen H (1998a).** Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *NeuroReport* 9: 3415-3419.
- Haffner SM, Miettinen H, Karhapaa P, Mykkanen L, Laakso M (1997).** Leptin concentrations, sex hormones, and cortisol in nondiabetic men. *J Clin Endocrinol Metab* 82(6): 1807-1809.
- Haffner SM (2000).** Sex hormones, obesity, fat distribution, type 2 diabetes and insulin resistance: epidemiological and clinical correlation. *Int J Obes Metab Disord* 24(2): 56-58.
- Hagan MM, Rushing PA, Schwartz MW, Yagaloff KA, Burn P, Woods SC, Seeley RJ (1999).** Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. *J Neurosci* Mar 15;19(6): 2362-2367.

- Hakansson ML, Meister B (1998).** Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 68(6): 420-427.
- Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B (1998).** Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18(1): 559-572.
- Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM (1997).** Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(16): 8878-8883.
- Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M (1995).** Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med* 1(9): 953-956.
- Hansen MJ, Morris MJ (2002).** Evidence for an interaction between neuropeptide Y and the melanocortin-4 receptor on feeding in the rat. *Neuroendocrinology* 42: 792-797.
- Hardie LJ, Guilhot N, Trayhurn P (1996).** Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res* 28(12): 685-689.
- Harfstrand A, Cintra A, Fuxe K, Aronsson M, Wikstrom AC, Okret S, Gustafsson JA, Agnati LF (1989).** Regional differences in glucocorticoid receptor immuno-reactivity among neuropeptide Y immunoreactive neurons of the rat brain. *Acta Physiol Scand* 135: 3-9.
- Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC (1996).** Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest* 97(9): 2020-2026.
- Harris RBS (2000).** Leptin - much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr* 20: 45-75.
- Haskell-Luevano C, Chen P, Li C, Chang K, Smith MS, Cameron JL, Cone RD (1999).** Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immuno-reactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology* 140(3): 1408-1415.
- Haskell-Luevano C, Monck EK (2001).** Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regul Pept* 99(1): 1-7.
- Havel PJ, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL, Stern JS (1996).** Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 81(12): 4406-4413.
- Hebebrand J, Sommerlad C, Geller F, Gorg T, Hinney A (2001).** The genetics of obesity: practical implications. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 1: 10-18.
- Herzog H, Hort YJ, Ball HJ, Hayes G, Shine J, Selbie AL (1992).** Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5794-5798.
- Higuchi H, Yang HY, Sabol SL (1988).** Rat neuropeptide Y precursor gene expression. mRNA structure, distribution, and regulation by glucocorticoids, cyclic AMP, and phorbol ester. *J Biol Chem* 263: 6288-6295.

- Hill RA, Margetic S, Pegg GG, Gazzola C (1998).** Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22(8): 765-770.
- Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Gorg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J (1999).** Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84(4): 1483-1486.
- Hisano S, Kagotani Y, Tsuruo Y, Daikoku S, Chihara K, Whitnall MH (1988).** Localization of glucocorticoid receptor in neuropeptide Y-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 95: 13-18.
- Holets VR, Hökfelt T, Rökaeus Å, Terenius L, Goldstein M (1988).** Locus coeruleus neurons in the rat containing neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase, or galanin and their efferent projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus. *Neuroscience* 24: 893-906.
- Horvath TL, Naftolin F, Kalra SP, Leranth C (1992).** Neuropeptide-Y innervation of b-endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. *Endocrinology* 131: 2461-2467.
- Horvath TL, Naftolin F, Leranth C, Sahu A, Kalra SP (1996).** Morphological and pharmacological evidence for neuropeptide Y-galanin interaction in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 137: 3069-3077.
- Hu Y, Bloomquist BT, Cornfield LJ, DeCarr LB, Flores-Riveros JR, Friedman L, Jiang P, Lewis-Higgins L, Sadlowski Y, Schaefer J, Velazquez N, McCaleb ML (1996).** Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J Biol Chem* 271: 26315-26319.
- Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP (1983).** Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 67(5): 968-977.
- Hufnagel C (2001).** Ontogenetische Veränderung des Plasmaleptinspiegels und seine Regulation bei 10 Tage alten Ratten. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F (1997).** Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88(1): 131-141.
- Jacobowitz DM, O'Donohue TL (1978).** alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(12): 6300-6304.
- Janssen JA, Huizenga NA, Stolk RP, Grobbee DE, Pols HA, de Jong FH, Attanasio AM, Blum WF, Lamberts SW (1998).** The acute effect of dexamethasone on plasma leptin concentrations and the relationships between fasting leptin, the IGF-I/IGFBP system, dehydroepiandrosterone, androstenedione and testosterone in an elderly population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48(5): 621-626.

- Jegou S, Blasquez C, Delbende C, Bunel DT, Vaudry H (1993).** Regulation of alpha-melanocyte-stimulating hormone release from hypothalamic neurons. *Ann N Y Acad Sci* 680: 260-278.
- Jhanwar-Uniyal M, Chua SC Jr (1993).** Critical effects of aging and nutritional state on hypothalamic neuropeptide Y and galanin gene expression in lean and genetically obese Zucker rats. *Mol Brain Res* 19: 195-202.
- Kalra PS, Dube MG, Xu B, Kalra SP (1996a).** Increased neuropeptide Y (NPY)-receptor sensitivity may underlie hyperphagia and obesity: a novel mechanism. Program of the Annual Conference of the North American Association for the Study of Obesity, Breckenridge, CO.
- Kalra SP, Kalra PS (1996b).** Is neuropeptide Y a naturally occurring appetite transducer? *Curr Opin Endocrinol Diab* 3: 157-163.
- Kalra SP (1997).** Appetite and body weight regulation: is it all in the brain? *Neuron* 19(2): 227-230.
- Kalra PS, Dube MG, Xu B, Farmerie WG, Kalra SP (1998a).** Neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor mRNA is upregulated in association with transient hyperphagia and body weight gain: evidence for a hypothalamic site for concurrent development of leptin resistance. *J Neuroendocrinol* 10: 43-49.
- Kalra PS, Dube MG, Xu B, Farmerie WG, Kalra SP (1998b).** Evidence that dark-phase hyperphagia induced by neurotoxin 6-hydroxy-dopamine may be due to decreased leptin and increased NPY signaling. *Physiol Behav* 63: 829-835.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS (1999).** Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20(1): 68-100.
- Kamoda T, Saitoh H, Nakahara S, Izumi I, Hirano T, Matsui A (1998).** Serum leptin and insulin concentrations in prepubertal lean, obese and insulin-dependent diabetes mellitus children. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49(3): 385-389.
- Kaneda T, Makino S, Nishiyama M, Asaba K, and Hashimoto K (2001).** Differential neuropeptide responses to starvation with aging. *J Neuroendocrinol* 13: 1066-1075.
- Kask A, Rago L, Wikberg JE, Schioth HB (1998).** Evidence for involvement of the melanocortin MC4 receptor in the effects of leptin on food intake and body weight. *Eur J Pharmacol* 360(1): 15-19.
- Kennedy GC (1953).** The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc Roy Soc Lond* 140: 578-592.
- Kesterson RA, Huszar D, Lynch CA, Simerly RB, Cone RD (1997).** Induction of neuropeptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamic nucleus in two models of the agouti obesity syndrome. *Mol Endocrinol* 11: 630-637.

- Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG, Habener JF (1997).** Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 46(6): 1087-1093.
- Kim EM, Grace MK, Welch CC, Billington CJ, Levine AS (1999).** STZ-induced diabetes decreases and insulin normalizes POMC mRNA in arcuate nucleus and pituitary in rats. *Am J Physiol* 276(5 Pt 2): R1320-R1326.
- King PJ, Widdowson PS, Doods HN, Williams G (1999).** Regulation of neuropeptide Y release by neuropeptide Y receptor ligands and calcium channel antagonists in hypothalamic slices. *J Neurochem* 73: 641-646.
- Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, Mudaliar SR, Olefsky J, Caro JF (1996).** Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 45(5): 699-701.
- Kopelman PG (2000).** Obesity as a medical problem. *Nature* 404(6778): 635-643.
- Korner J, Savontaus E, Chua SC Jr, Leibel RL, Wardlaw SL (2001).** Leptin regulation of *Agrp* and *NPY* mRNA in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 13: 959-966.
- Kowalski C, Micheau J, Corder R, Gaillard R, and Conte-Devolx B (1992).** Age-related changes in cortico-releasing factor, somatostatin, neuropeptide Y, methionine enkephalin and β -endorphin in specific rat brain areas. *Brain Res* 582: 38-46.
- Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ (1998).** Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol* 391(1): 115-132.
- Kristensen K, Pedersen SB, Richelsen B (1999).** Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 259(3): 624-630.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S (1998).** Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393(6680): 72-76.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A (1998).** Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* Jun 19(2): 155-157.
- Kuhar MJ, Adams S, Dominguez G, Jaworski J, Balkan B (2002).** CART peptides. *Neuropeptides* 36(1): 1-8.
- Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM, Hurley JD, Smith DM, Ghatei MA, Withers DJ, Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A (1998).** Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19(2): 155-157.
- Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ (1998).** CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29(4): 293-298.

- Landt M (2000).** Leptin binding and binding capacity in serum. *Clin Chem* 46(3): 379-384.
- Larsen PJ, Sheikh SP, Jakobsen CR, Schwartz TW, Mikkelsen JD (1993).** Regional distribution of putative NPY Y1 receptors and neurons expressing Y1 mRNA in forebrain areas of the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 5: 1622–1637.
- Larsen PJ, Jessop DS, Chowdrey HS, Lightman SL, Mikkelsen JD (1994).** Chronic administration of glucocorticoids directly upregulates prepro-neuropeptide Y and Y1 -receptor mRNA levels in the arcuate nucleus of the rat. *J Neuroendocrinol* 6: 153–159.
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996).** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379(6566): 632-635.
- Levin BE (1986).** Neurological Regulation of body weight. *CRC Critical Reviews in Clinical Neurobiology* 2(N1): 1-60.
- Lewis DE, Shellard L, Koeslag DG, Boer DE, McCarthy HD, McKibbin PE, Russell JC, Williams G (1993).** Intense exercise and food restriction cause similar hypothalamic neuropeptide Y increases in rats. *Am J Physiol* 264: E279-284.
- Li BH, Xu B, Rowland NE, Kalra SP (1994).** c-fos Expression in the rat brain following central administration of neuropeptide Y and effects of food consumption. *Brain Res* 665: 277–284.
- Li C, Chen P, Smith MS (1998).** The acute suckling stimulus induces expression of neuropeptide Y (NPY) in cells in the dorsomedial hypothalamus and increases NPY expression in the arcuate nucleus, *Endocrinology* 139: 1645-1652.
- Li H, Matheny M, Tümer N, Scarpace PJ (1998a).** Aging and fasting regulation of leptin and hypothalamic neuropeptide Y gene expression. *Am J Physiol* 275: E405-E411.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI (1998).** Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394(6696): 897-901.
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, Cone RD (1994).** Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371(6500): 799-802.
- MacIntyre DE, Glueck SB (2003).** The proof of the pudding is the eating: Editorial Focus on "Hyperphagia, not hypometabolism, causes early onset obesity in melanocortin-4-receptor knockout mice". *Physiol Genomics* 13: 11-14.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al (1995).** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1(11): 1155-1161.
- Makimura H, Mizuno TM, Isoda F, Beasley J, Silverstein JH, Mobbs CV (2003).** Role of glucocorticoids in mediating effects of fasting and diabetes on hypothalamic gene expression. *BMC Physiol* 3(1): 5.

- Mao Y, Pan S, Wen SW, Johnson KC; Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group (2003).** Physical inactivity, energy intake, obesity and the risk of rectal cancer in Canada. *Int J Cancer* 105(6): 831-837.
- Marsh DJ, Miura GI, Yagaloff KA, Schwartz MW, Barsh GS, Palmiter RD (1999a).** Effects of neuropeptide Y deficiency on hypothalamic agouti-related protein expression and responsiveness to melanocortin analogues. *Brain Research* 848: 66-77.
- Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Palmiter RD (1999b).** Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 21(1): 119-122.
- Marti A, Corbalan MS, Forga L, Martinez JA, Hinney A, Hebebrand J (2003).** A novel nonsense mutation in the melanocortin-4 receptor associated with obesity in a Spanish population. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27(3): 385-388.
- Mason MM, He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M (1998).** Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology* 139(3): 1013-1022.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y, Jingami H, Kawada T, Nakao K (1995).** Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 44: 855-858.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K (1997).** Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3(9): 1029-1033.
- Matthews J, Jansen M, Lyarly D, Cox R, Chen W-J, Koller K, Daniels AJ (1997).** Pharmacological characterization and selectivity of the NPY antagonist GR231118 (1229U91) for different NPY receptors. *Regul Pept* 72: 113-119.
- McMinn JE, Wilkinson CW, Havel PJ, Woods SC, Schwartz MW (2000).** Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(2): R695-R703.
- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P (1996a).** Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387(2-3): 113-116.
- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ, Trayhurn P (1996b).** Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 8(10): 733-735.
- Mercer JG, Moar KM, Rayner DV, Trayhurn P, Hoggard N (1997).** Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (ob/ob) and cold-exposed lean mice. *FEBS Lett* 402(2-3): 185-188.

- Mercer JG, Moar KM, Ross AW, Morgan PJ (2000).** Regulation of leptin receptor, POMC and AGRP gene expression by photoperiod and food deprivation in the hypothalamic arcuate nucleus of the male Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Appetite* 34(1): 109-111.
- Meister B, Ceccatelli S, Hökfelt T, Anden NE, Anden M, Theodorsson E (1989).** Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res* 76: 343-368.
- Meister B (2000).** Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm* 59: 265-304.
- Mikkelsen JD, Larsen PJ (1992).** A high concentration of NPY (Y1)-receptor mRNA-expressing cells in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 148: 195-198.
- Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV (1998).** Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47(2): 294-297.
- Mizuno TM, Makimura H, Silverstein J, Roberts JL, Lopingco T, Mobbs CV (1999).** Fasting regulates hypothalamic neuropeptide Y, agouti-related peptide, and proopiomelanocortin in diabetic mice independent of changes in leptin or insulin. *Endocrinology* 140(10): 4551-4557.
- Mizuno TM, Mobbs CV (1999).** Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology* 140: 814-817.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD (1994).** Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8(10): 1298-1308.
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E (1999).** Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140(12): 5995-5998.
- Morley JE (1987).** Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocr Rev* 8: 256-287.
- Morley JE (2001).** Decreased food intake with aging. *J Gerontol Series A Bio Sci Med Sci* 56 Spec No 2(2): 81-88.
- Morton NM, Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA (1998).** Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem* 273(40): 26194-26201.
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD (1994).** Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8(10): 1298-1308.
- Müller G, Ertl J, Gerk M, Preibisch G (1997).** Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 272: 1518-1522.

- Murakami T, Iida M, Shima K (1995).** Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 214(3): 1260-1267.
- Nicolaidis S (1978).** Neural mechanism of energy equilibrium. *J Annu Diabetol Hotel Dieu* 1:15: 153-156.
- Oliver P, Pico C, Palou A (2001).** Ontogenesis of leptin expression in different adipose tissue depots in the rat. *Pflugers Arch* 442(3): 383-390.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS (1997).** Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278(5335): 135-138.
- O'Shea D, Morgan DGA, Meeran K, Edwards CMB, Turton MD, Choi SJ, Heath MM, Gunn I, Taylor GM, Howard JK, Bloom CI, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR (1997).** Neuropeptide Y induced feeding in the rat is mediated by a novel receptor. *Endocrinology* 138: 196-202.
- Pardridge WM (1986).** Receptor-mediated peptide transport through the blood-brain barrier. *Endocr Rev* 7(3): 314-330.
- Pelleymounter MA (1997).** Leptin and the physiology of obesity. *Curr Pharmaceut Des* 3: 85-98.
- Pighetti GM, Hitt DC, Gimble JM (1999).** Leptin: its role in hematopoiesis and bone formation. *J Clin Ligand Assay* 22: 239-241.
- Poitout V, Rouault C, Guerre-Millo M, Reach G (1998).** Does leptin regulate insulin secretion? *Diabetes Metab* 24(4): 321-326.
- Powley TL, Opsahl CH, Cox JE, Weingarten HP (1980).** The role of the hypothalamus in energy homeostasis. In: Morgane PJ, Panksepp J (eds) *Handbook of the Hypothalamus. Part A: Behavioral Studies of the Hypothalamus*. Marcel Dekker, Inc., New York, Vol 3: 211-298.
- Pritchard LE, Turnbull AV, White A (2002).** Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signaling and obesity. *J Endocrinol* 172(3): 411-421.
- Pu S, Dube MG, Xu B, Kalra SP, Kalra PS (1998).** Induction of neuropeptide Y (NPY) gene expression in novel hypothalamic sites in association with transient hyperphagia and body weight gain. Program of the 80th Annual Meeting of The Endocrine Society, New Orleans, LA, 1998 (Abstract P3-236), p 435.
- Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, Speizer FE, Manson JE (1997).** A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. *JAMA* 277(19): 1539-1545.
- Rizk NM, Liu LS, Eckel J (1998).** Hypothalamic expression of neuropeptide-Y in the New Zealand obese mouse. *Int J Obes* 22: 1172-1177.

- Roselli-Reh fuss L, Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Low MJ, Tatro JB, Entwistle ML, Simerly RB, Cone RD (1993).** Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(19): 8856-8860.
- Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, Leibel RL (1996).** Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 81(9): 3424-3427.
- Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Rossell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghati MA, Bloom SR (1998).** A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139: 4428-4431.
- Rousseau V, Becker DJ, Ongemba LN, Rahier J, Henquin J-C, Brichard SM (1997).** Developmental and nutritional changes of ob and PPAR γ 2 gene expression in rat white adipose tissue. *Biochem J* 321: 451-456.
- Sachs L (1997).** *Angewandte Statistik: Statistische Methoden und ihre Anwendung*, 8. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Sahu A, Dube MG, Kalra SP, Kalra PS (1988a).** Bilateral neural transection at the level of mesencephalon increase food intake and reduce latency to onset of feeding in response to neuropeptide Y. *Peptides* 9: 1269-1273.
- Sahu A, Kalra SP, Crowley WR, Kalra PS (1988b).** Evidence that NPY-containing neurons in the brainstem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior. *Brain Res* 457: 376-378.
- Sahu A, Phelps CP, White JD, Crowley WR, Kalra SP, Kalra PS (1992).** Steroidal regulation of hypothalamic neuropeptide Y release and gene expression. *Endocrinology* 130: 3331-3336.
- Sahu A, Crowley WR, Kalra SP (1994).** Hypothalamic neuropeptide-Y gene expression increases before the onset of the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 134: 1018-1022.
- Sahu A, Dube MG, Phelps CP, Sninsky CA, Kalra PS, Kalra SP (1995).** Insulin and Insulin-Like Growth Factor II Suppress Neuropeptide Y Release from the Nerve Terminals in the Paraventricular Nucleus: A Putative Hypothalamic Site for Energy Homeostasis. *Endocrinology* 136(12): 5718-5724.
- Sahu A (1998).** Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology* 139(2): 795-798.
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J (1995).** Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377(6549): 527-529.
- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM (1979).** An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. *J Comp Neurol* 183(4): 689-706.

- Sar M, Sahu A, Crowley WR, Kalra SP (1990).** Localization of neuropeptide-Y immunoreactivity in estradiol-concentrating cells in the hypothalamus. *Endocrinology* 127: 2752-2756.
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Masuzaki H, Yoshimasa Y, Nakao K (1998).** Satiety effect and sympathetic activation of leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system. *Neurosci Lett* 249(2-3): 107-110.
- Scarpace PJ, Matheny M, Zhang Y, Tümer N, Frase CD, Shek EW, Hong B, Prima V, and Zolotukhin S (2002).** Central leptin gene delivery evokes persistent leptin signal transduction in young and aged-obese rats but physiological responses become attenuated over time in aged-obese rats. *Neuropharm* 42: 548-561.
- Schaffhauser AO, Stricker-Krongrad A, Brunner L, Cumin F, Gerald C, Whitebread S, Criscione L, Hofbauer KG (1997).** Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* 46: 1792-1798.
- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte Jr D (1992).** Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13: 387-414.
- Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D Jr, Woods SC, Seeley RJ, Weigle DS (1996a).** Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45(4): 531-535.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1996b).** Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98: 1101-1106.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1997).** Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46(12): 2119-2123.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG (2000).** Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778): 661-671.
- Schioth HB, Muceniece R, Wikberg JE (1997).** Characterization of the binding of MSH-B, HB-228, GHRP-6 and 153N-6 to the human melanocortin receptor subtypes. *Neuropeptides* 31(6): 565-571.
- Sclafani A (1971).** Neural pathways involved in the ventromedial hypothalamic lesion syndrome in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 77: 70-96.
- Sclafani A, Kirchgessner A (1986).** The role of the medial hypothalamus in the control of food intake: an update. In: Ritter RC, Ritter S, Barnes CD (eds) *Feeding Behavior*. Academic Press, New York, pp 27-66.
- Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Thiele TE, van Dijk G, Baskin DG, Schwartz MW (1997).** Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature* 390(6658): 349.

- Shintani, M., H. Nishimura, S. Yonemitsu, H. Masuzaki, Y. Ogawa, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa und K. Nakao (2000).** Downregulation of leptin by free fatty acids in rat adipocytes: effects of triacsin C, palmitate, and 2-bromopalmitate. *Metabolism* 49(3): 326-330.
- Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N, Mori M (1997).** Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 154(2): 285-292.
- Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Lüthy R, Stark KL (1997).** Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11: 593-602.
- Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR (1998).** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281(5383): 1683-1686.
- Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF (1996a).** Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98(6): 1277-1282.
- Sivan E, Whittaker PG, Sinha D, Homko CJ, Lin M, Reece EA, Boden G (1998).** Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. *Am J Obstet Gynecol* 179(5): 1128-1132.
- Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW (1996).** Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 271(10): 5301-5304.
- Smith SM (1993).** Lactation alters neuropeptide-Y and proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat. *Endocrinology* 133: 1258-1265.
- Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford ML (1997).** Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* 390: 521-525.
- Stanley BG, Chin AS, Leibowitz SF (1985).** Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Res Bull* 14: 521-524.
- Stanley BG, Magdalin W, Seirafi A, Thomas WJ, Leibowitz SF (1993).** The perifornical area: the major focus of (a) patchily distributed hypothalamic neuropeptide Y-sensitive feeding system(s). *Brain Res* 604: 304-317.
- Steiner RA, Kabigting E, Lent K, Clifton DK (1994).** Diurnal rhythm in proopiomelanocortin mRNA in the arcuate nucleus of the male rat. *J Neuroendocrinol* 6: 603-608.
- Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, MacKellar W, Rosteck PR, Schonder B, Smith D, Tinsley FC, Zhang XY, Heiman M (1995).** The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377(6549): 530-532.

- Stephenson GD, Rose DP (2003).** Breast cancer and obesity: an update. *Nutr Cancer* 45(1): 1-16.
- Steppan CM, Swick AG (1999).** A role for leptin in brain development. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 600-602.
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD (1998).** A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18(3): 213-215.
- Takahashi Y, Okimura Y, Mizuno I, Takahashi T, Kaji H, Uchiyama T, Abe H, Chihara K (1996).** Leptin induces tyrosine phosphorylation of cellular proteins including STAT-1 in human renal adenocarcinoma cells, ACHN. *Biochem Biophys Res Commun* 228(3): 859-864.
- Tartaglia AL, Dembski M, Wenig X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield AL, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI (1995).** Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
- Thiele TE, van Dijk G, Yagaloff KA, Fisher SL, Schwartz M, Burn P, Seeley RJ (1998).** Central infusion of melanocortin agonist MTII in rats: assessment of c-Fos expression and taste aversion. *Am J Physiol* 274(1 Pt 2): R248-R254.
- Thim L, Kristensen P, Larsen PJ, Wulff BS (1998).** CART, a new anorectic peptide. *Int J Biochem Cell Biol* 30(12): 1281-1284.
- Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997).** Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* 138(11): 5063-5066.
- Trayhurn P, Thomas ME, Duncan JS, Rayner DV (1995).** Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett* 368(3): 488-490.
- Trayhurn P, Duncan JS, Hoggard N, Rayner DV (1998).** Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proc Nutr Soc* 57(3): 413-419.
- Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV (1999).** Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 1: 22-28.
- Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM (1996).** Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 14(1): 95-97.
- Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P (1998).** A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20(2): 113-114.
- Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P (2000).** Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 106(2): 253-262.
- Vergoni AV, Bertolini A (2000).** Role of melanocortins in the central control of feeding. *Eur J Pharmacol* 405: 25-32.

- Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT, Kristensen P (1999).** Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci* 19(10): RC5.
- Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, Rascher W, Teller W, Tornqvist H, Hauner H (1996).** Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 45(10): 1435-1438.
- Wabitsch M, Blum WF, Muche R, Braun M, Hube F, Rascher W, Heinze E, Teller W, Hauner H (1997).** Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 100(4): 808-813.
- Wagner R, Oberste-Berghaus C, Herpertz S, Blum WF, Pelz B, Hebebrand J, Senf W, Mann K, Albers N (2000).** Time relationship between circadian variation of serum levels of leptin, insulin and cortisol in healthy subjects. *Horm Res* 54(4): 174-180.
- Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L (1998).** A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393(6686): 684-688.
- Wang J, Liu R, Liu L, Chowdhury R, Barzilai N, Tan J, Rossetti L (1999).** The effect of leptin on Lep expression is tissue-specific and nutritionally regulated. *Nat Med* 5(8): 895-899.
- Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH (1996).** A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett* 392(2): 87-90.
- Wardlaw SL, McCarthy KC, Conwell IM (1998).** Glucocorticoid regulation of hypothalamic proopiomelanocortin. *Neuroendocrinology* 67(1): 51-57.
- Watson SJ, Barchas JD, Li CH (1977).** beta-Lipotropin: localization of cells and axons in rat brain by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(11): 5155-5158.
- Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF (2000).** Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 143(3): 293-311.
- Wechsler JG, Hutt V, Wenzel H, Klor HU, Ditschuneit H (1981).** Lipids and lipoproteins during a very-low-calorie diet. *Int J Obes* 5(3): 325-331.
- Weide K, Christ N, Moar KM, Arens J, Hinney A, Mercer JG, Eiden S, Schmidt I (2003).** Hyperphagia, not hypometabolism, causes early onset obesity in melanocortin-4 receptor knockout mice. *Physiol Genomics* 13(1): 47-56.
- Weingarten HP, Chang PK, McDonald TJ (1985).** Comparison of the metabolic and behavioral disturbances following paraventricular-and ventromedial-hypothalamic lesions. *Brain Res Bull* 14: 551-559.
- Wiesner G, Vaz M, Collier G, Seals D, Kaye D, Jennings G, Lambert G, Wilkinson D, Esler M (1999).** Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 84(7): 2270-2274.
- Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1995).** Weight, weight change, and coronary heart disease in women. Risk within the 'normal' weight range. *JAMA* 273(6): 461-465.

- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH (2001).** The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74(4-5): 683-701.
- Wilson BD, Bagnol D, Kaelin CB, Ollmann MM, Gantz I, Watson SJ, Barsh GS (1999).** Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology* 140(5): 2387-2397.
- Wolff GL, Galbraith DB, Domon OE, Row JM (1978).** Phaeomelanin synthesis and obesity in mice. Interaction of the viable yellow (Avy) and sombre (eso) mutations. *J Hered* 69(5): 295-298.
- Woods SC, Seeley RJ (2000).** Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 16: 894-902.
- Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ (2000).** Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol* 51: 255-277.
- Woods SC, Gotoh K, Clegg DJ (2003).** Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 228(19): 1175-1180.
- World Health Organization (1997a).** Preventing and managing the Global Epidemic - Report of a WHO Consultation on Obesity, 3-5 June 1997, Executive summary.
- World Health Organization (1997b).** World Health Report 1997.
- World Health Organization (2003).** Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Health Organ Tech Rep Ser 916: i-viii, 1-149, backcover.
- Wu-Peng S, Rosenbaum M, Nicolson M, Chua SC, Leibel RL (1999).** Effects of exogenous gonadal steroids on leptin homeostasis in rats. *Obes Res* 7(6): 586-592.
- Xu B, Li BH, Rowland NE, Kalra SP (1995).** Neuropeptide Y injection into the fourth cerebroventricle stimulates c-fos expression in the paraventricular nucleus and other nuclei in the forebrain: effect of food consumption. *Brain Res* 698: 227-231.
- Xu B, Kalra PS, Kalra SP (1996).** Food restriction upregulates hypothalamic NPY gene expression: loss of daily rhythmicity. Program of the 26th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, Vol 22: 1685.
- Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S (1998).** A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20(2): 111-112.
- Yeo GS, Farooqi IS, Challis BG, Jackson RS, O'Rahilly S (2000).** The role of melanocortin signaling in the control of body weight: evidence from human and murine genetic models. *QJM* 93(1): 7-14.
- Young JI, Otero V, Cerdan MG, Falzone TL, Chan EC, Low MJ, Rubinstein M (1998).** Authentic cell-specific and developmentally regulated expression of pro-opiomelanocortin genomic fragments in hypothalamic and hindbrain neurons of transgenic mice. *J Neurosci* 18(17): 6631-6640.

- Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad A, Boss O, Ricquier D, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F (1999).** Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes* 48(2): 365-370.
- Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorch LP, Bhat GK, Brann DW (1997).** Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 65(3): 223-228.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994).** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505): 425-432.
- Zhang Y, Olbort M, Schwarzer K, Nusslein-Hildesheim B, Nicolson M, Murphy E, Kowalski TJ, Schmidt I, Leibel RL (1997).** The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 240(2): 492-495.
- Zhang Y, Hufnagel C, Eiden S, Guo KY, Diaz PA, Leibel R, Schmidt I (2001).** Mechanisms for LEPR-mediated regulation of leptin expression in brown and white adipocytes in rat pups. *Physiol Genomics* 4(3): 189-199.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich mit Rat und Tat, Geduld und Zuversicht unterstützt haben.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Ingrid Schmidt am Max-Planck-Institut/W.G. Kerckhoff-Institut in Bad Nauheim für die Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit, die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, bedanken. Ich bedanke mich für ihre ständige Unterstützung und ihre liebevolle Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit. Zudem ermöglichte mir Frau Schmidt die Teilnahme an verschiedenen Kongressen, bei denen ich Teile meiner Arbeit präsentieren konnte.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst-Werner Korf an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main. Herr Korf gab mir die Möglichkeit, den praktischen Teil meiner Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und stand mir mit unermüdlichem Eifer und Sachkompetenz zur Seite. Er förderte meine wissenschaftliche Tätigkeit und war mir eine große Hilfe beim Anfertigen von Vorträgen und Präsentationen.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Zimmermann als dem Vorsitzenden des Graduiertenkollegs Neuronale Plastizität der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main recht herzlich für die 3-jährige Förderung meiner Arbeit bedanken. Das Graduiertenkolleg gab mir die Möglichkeit, über den Tellerrand meines Arbeitsgebietes hinauszublicken und zusammen mit anderen Graduierten viele verschiedene interessante Einblicke in die Forschung zu gewinnen. Neben meiner Arbeit förderte das Graduiertenkolleg die Teilnahme an verschiedenen Auslandsaufenthalten, bei denen ich Teile meiner Arbeit erheben, aber auch präsentieren konnte.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eckhart Simon, der trotz seiner Emeritierung stets ein offenes Ohr für mich hatte. Sein großer Wissensschatz und seine ebenso große Einsatzbereitschaft hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mit freudigem Interesse half Herr Simon mir, die statistische Auswertung der Daten zu bewältigen. Die Zusammenarbeit mit ihm machte mir besonderen Spaß.

Herrn Prof. Dr. Gerstberger bin ich für die Vertretung meiner Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen dankbar.

Für die Hilfe bei der radioaktiven *in situ* Hybridisierung bedanke ich mich ganz herzlich bei der Arbeitsgruppe von Dr. Julian Mercer am Rowett Research Institute in Aberdeen, Schottland, im speziellen bei Kim Moar, die mich freundlich, geduldig und sehr kompetent in diese Methodik eingearbeitet hat, und mich während meiner Aufenthalte dort persönlich betreute.

Ich möchte mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe in Bad Nauheim recht herzlich für ihre Unterstützung und Hilfe beim Anfertigen dieser Arbeit und für das angenehme Arbeitsklima bedanken:

Frau Karin Weide unterstützte mich bei allen Fragestellungen bezüglich der MC4R-defizienten Mäuse. Ich habe ihre Gesellschaft in unserem gemeinsamen Arbeitszimmer immer genossen und es machte mir großen Spaß mit Karin in Schottland zusammen zu arbeiten.

Bei Roswitha Bender und Diana Fuchs möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Durchführung der PCRs und der RIAs bedanken.

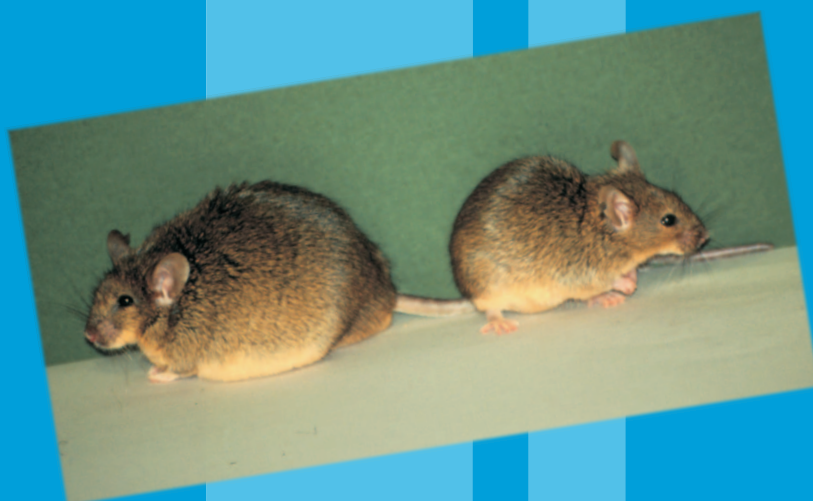
Mein Dank gilt Andrea, Sandra, Alex, Karin, Sina, Michaela und Birgit für das tolle Arbeitsklima und ihre nette Hilfe bei allen Fragen und Problemen.

Frank Voss und Helmut Busch aus der Computerabteilung in Bad Nauheim danke ich für die Hilfe bei der Beseitigung von Computer-Problemen aller Art.

Ich möchte mich ebenfalls recht herzlich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe in Frankfurt am Main bedanken. Ich habe mich in dem angenehmen Arbeitsklima sehr wohl gefühlt und meine Zeit in Frankfurt sehr genossen. Durch den ständigen wissenschaftlichen Austausch innerhalb der Arbeitsgruppe bekam ich einen Einblick in verschiedene Forschungsbereiche und konnte dadurch meinen wissenschaftlichen Horizont erweitern. Dafür bedanke ich mich bei Marco Koch, Johannes Hennings, Gisela Müller, Christof Schomerus, Jörg Stehle, Faramaz Deghani und dem Rest der Arbeitsgruppe.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Qian Zhang an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main, für die geduldige und kompetente Einarbeitung in die Methodik der nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Monika und Addi Arens, die mich stets auf jede nur erdenkliche Weise bei der Verwirklichung meiner Ziele unterstützt haben und mir mein Studium und damit das Anfertigen dieser Arbeit ermöglicht haben. Ich danke meiner Schwester Anja und meiner besten Freundin Anke Bremer für ihre ständigen Aufmunterungen und ihre moralische Unterstützung während einiger Durststrecken und ihre Freude bei Erfolgen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-029-7



9 783896 870292